

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG UND
CHARAKTERISIERUNG KOLLAGENOLYTISCHER
ENZYME AUS EINEM ACHROMOBACTERSTAMM**

Rudolf Lang

München 1971

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung München
(Abteilung Prof. Dr. K. Hannig)

Untersuchungen zur Isolierung und Charakterisierung kollagenolytischer
Enzyme aus einem Achromobacterstamm

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rudolf Lang

aus

Augsburg

München 1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hannig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bücher

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 12. 71



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1970 bis März 1971 am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K. Hannig bin ich für sein Wohlwollen und das freundliche Entgegenkommen zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Strauch danke ich für seine Ratschläge und seine Hilfsbereitschaft.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553801_0018

I n h a l t s a n g a b e

		Seite
A	Einleitung	1
B	Aufgabenstellung	6
C	Ergebnisse	7
I.	Suche nach dem optimalen Nährmedium	7
1.	Vorbemerkungen	7
a)	Bakterielles Wachstum	7
b)	Enzymproduktion der Bakterien	8
2.	Methodik	9
a)	Nährmedien	9
b)	Verfolgung des Wachstums	9
c)	Vorbereitung der Proben	9
d)	Enzymbestimmung	10
3.	Befunde	12
II.	Nachweis einer Peptidase und eines kollagenolytischen Enzyms.	16
1.	Methodik	16
a)	Züchtung	16
b)	Einengung der Medien	16
c)	Trennung mittels trägerfreier Elektrophorese	17
d)	Enzymbestimmungen	17
2.	Befunde	20
III.	Das kollagenolytische Enzym. Nähere Charakterisierung	24
1.	Kollagenabbau in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration	24
2.	Vergleich mit Clostridienpeptidase	25
a)	Viskosimetrie	25
b)	Diskelektrophorese	27
IV.	Die Peptidase	28
1.	Züchtung	28

	Seite
2. Untersuchungen zur Frage Exo- oder Endoenzym	28
a) Ermittlung der Wachstumskurve	28
b) Bestimmung der Enzymaktivität	29
3. Weitere Reinigung	30
a) Bestimmung der spezifischen Aktivität	30
b) Reinigungsversuche	31
α) Dialyse	31
β) Ultrafiltration	31
γ) Trägerfreie Elektrophorese	32
δ) Vorversuche für eine weitere Reinigung	33
ξ) Gelfiltration	36
ζ) Verfolgung der Reinigungsschritte	36
4. Charakterisierung der Peptidase	38
a) Lokalisation der Spaltstelle innerhalb des Pentapeptids	38
b) Molekulargewichtsbestimmung	39
c) pH-Optimum	40
d) Michaeliskonstante	40
5. Kollagenabbauversuch	42
D Diskussion	44
E Methodik	52
F Zusammenfassung	74
G Literaturverzeichnis	77

Einleitung:

Kollagen ist ein Hauptbestandteil des tierischen Bindegewebes. Es zählt zu den Faserproteinen, sein Molekül stellt ein 2900 Å langes, starres Stäbchen dar, das sich aus 3 Polypeptidketten, den sogenannten α -Ketten zusammensetzt. Jede dieser Ketten bildet eine Schraube (Helix). Verbinden sich zwei oder drei solcher Ketten durch intramolekulare Kräfte, so spricht man von β - oder γ -Ketten. Das komplette Molekül zeigt den Aufbau einer Tripelhelix, drei Ketten winden sich dabei um eine gemeinsame Achse.

Eine Kette enthält etwa 1000 Aminosäuren, wobei ein Drittel von Glycin, ein weiteres von Prolin und Hydroxyprolin gebildet wird. Durch die besondere Anordnung der Aminosäuren lassen sich zwei sich abwechselnde Bereiche innerhalb der Aminosäuresequenz nachweisen, sogenannte polare und apolare Bereiche. Letztere sind außerordentlich monoton, nämlich als polymere Sequenz Gly - Pro - x - Gly - Pro - x aufgebaut, wobei die Position x besonders häufig durch Hyp und Ala eingenommen wird. Durch laterale Aggregation der Moleküle entstehen Molekülverbände, die Fibrillen.

Durch Erhitzen wird die räumliche Struktur des Kollagens zerstört, aus dem nativen Kollagen wird Gelatine.

Dieses Bauprinzip des Kollagens ist der Grund für die geringe Angreifbarkeit durch unspezifische, proteolytische Enzyme. Dabei ist im Gegensatz zu früheren Ergebnissen zu betonen, daß gelöstes Kollagen durch Proteasen wie Trypsin, Pepsin und Pronase abgebaut werden kann (Kühn, K. u.a., 1966; Brettschneider, G. u.a., 1971), jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit sehr langsam.

Ein rascher enzymatischer Abbau erfolgt nur durch sogenannte **K o l l a g e n a s e n**. Nach der Definition kann ein proteolytisches Enzym als Kollagenase bezeichnet werden, wenn es natives Kollagen in fester oder löslicher Form unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,0 - 8,0 rasch und spezifisch zu spalten vermag (Mandl, I., 1961; Nordwig, A., 1962). Es wurde vorgeschlagen, den Namen Kollagenase nur solchen Proteasen vorzubehalten, die ausschließlich natives Kollagen abbauen, solche, die daneben auch andere Proteine

spalten, sollten als unspezifische kollagenolytische Enzyme bezeichnet werden (Nordwig,A. und Jahn,F., 1968).

Erste Beschreibungen über die verdauende Wirkung von Mikroorganismen auf unlösliches Kollagen, nämlich Sehnen, stammen noch aus dem vergangenen Jahrhundert (Bienstock,B., 1884). Exakte biochemische Untersuchungen in dieser Richtung stellte später Maschmann (Maschmann,E., 1938 a,b) an *Clostridium histolyticum* und *Clostridium perfringens* an. In der Folgezeit wurde eine Reihe von weiteren bakteriellen Kollagenasen beschrieben, die jedoch vielfach mit unzulänglichen Substraten wie Gelatine getestet waren und der Definition Kollagenase nichtgerecht werden.

Echte Kollagenasen wurden außer in *Clostridium perfringens* (Neumann, R.E. und Tytell,A.A., 1950) und *Clostridium histolyticum* (Jennison,M.W., 1947) nur an *Bacteroides melaninogenicus* (Hausmann,E., Kaufmann,E., 1969, weiteren *Bacteroides*-Stämmen, *Clostridium tetani*, sowie einem Stamm von *Staphylococcus aureus*, der Kollagengele jedoch nur unter anaeroben Bedingungen auflösen kann (Waldvogel,E.A. und Schwartz,M.N., 1969), nachgewiesen.

Nicht bakterielle Kollagenasen wurden im Exkret von Schmeißfliegen- und Dasselfliegenlarven (Hobson,R., 1931; Waterhouse,D. und Irzykiewicz,H., 1957), (Boulard,Ch., 1970) entdeckt.

Nachdem es Gross und Lapiere (Gross,J., Lapiere,C.M., 1962) in eleganter Weise gelungen war, die Existenz einer echten Kollagenase in der Schwanzflosse von Kaulquappen aufzuzeigen, wurden in schneller Folge solche Enzyme auch bei höheren Lebewesen, und schließlich auch beim Menschen gefunden (Eisen,A.Z., Bauer,E.A., Jeffrey,J.J., 1970).

Die Clostridiopeptidase A (EC 3.4.4.19), eine aus Kulturfiltraten von *Clostridium histolyticum* gewonnene Kollagenase erlangte besondere Bedeutung (s. Übersicht von Mandl,I. 1961). Das Enzym wurde zur Dispergierung von Zellen in Gewebekulturen, zur Behandlung von Brandwunden sowie wegen seiner hohen Spezifität zur Strukturauflösung des Kollagens verwendet.

Der Angriffspunkt liegt in den apolaren Bereichen des Kollagenmoleküls. Die dort vorliegende Sequenz Gly - Pro - x - Gly - Pro - x wird in spezifischer Weise an den mit Pfeilen gekennzeichneten Stellen gespalten. Die Voraussetzung für diesen Angriff ist eine

Sequenz von zwei Tripeptideinheiten oder mindestens 5 Aminosäuren, wobei an Stellung 2 und 5 Prolin oder Hydroxyprolin verlangt werden. Die Spaltung erfolgt an der N-terminalen Seite des Glycins, wobei als Endprodukte der Proteolyse Tripeptide der allgemeinen Struktur Gly - Pro - x entstehen (Nagai, Y., Noda, H., 1959; Grassmann, W., Hörmann, H., Nordwig, A. und Wünsch, E., 1959). Gleiche Spezifität wurde auch bei der Kollagenase aus *Clostridium perfringens* gefunden (Levdikova, G.A., 1966). Im Gegensatz dazu verlangt eine zweite von Schaub und Strauch aus *Clostridium histolyticum* isolierte Kollagenase an Stellung x der oben angegebenen Sequenz die Aminosäure Lysin (Schaub, M. und Strauch, L., 1968).

Es war naheliegend, zur Aktivitätsbestimmung solcher Enzyme neben Kollagen als hochmolekularem Substrat niedermolekulare, synthetische Peptide zu verwenden. Die Messung von Aktivitäten wurde tatsächlich viel einfacher und empfindlicher, nachdem Wünsch (Wünsch, E., 1963) und Yoshida (Yoshida, E. und Noda, N., 1965) den apolaren Bereichen analog gebaute Peptidsubstrate synthetisiert hatten. Das Kollagenasesubstrat PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg (PZ = p-phenylazo - benzyloxycarbenyl) wurde besonders häufig angewandt (Wünsch, E. und Heidrich, H.G., 1963). Von den üblichen proteolytischen Enzymen wie Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin u.ä. wird es nicht gespalten (Strauch, L., 1967).

Eine Reihe von Enzymen, die Aktivität gegenüber solchen Modellpeptiden besitzen, wurde in letzter Zeit beschrieben. So unter den Bakterien bei *Pseudomonas aeruginosa* (Schoellmann, G., Fischer, E.J., 1966), unter den höheren Lebewesen im Graaf'schen Follikel des Kaninchens (Espey, L.L. und Rondell, P., 1967, in He - La - Zellen und anderen Säugerzellen (Strauch, L., Vencelj, H., 1967), in der Hornhaut von Rinderaugen (Slansky, H.H., Freeman, M.I., Itoi, M., 1968), sowie im Tumorgewebe (Strauch, L., 1969), im Rattenknochen (Aer, J. und Kivirikko, K.J., 1969) und im menschlichen Serum (Gries, G. u.a., 1970).

Einige Autoren zogen in Anlehnung an die Eigenschaften der Clostridienpeptidase den Schluß, daß eine Spaltung niedermolekularer Modellpeptide auch einen Abbau des hochmolekularen, nativen

Kollagenmoleküls bedeutet. Enzyme, bei denen allein ihre Aktivität gegenüber dem synthetischen Substrat feststand, wurden oft kritiklos als Kollagenasen bezeichnet. Inzwischen wurde bereits in verschiedenen Arbeiten (Heidrich, H.G. u.a., 1969, Waldvogel, F.A. und Swartz, M.N., 1969, Harper, E., Gross, J., 1970, Aer, J. u.a., 1969) darüber berichtet, daß derartige Enzyme meist auf das native Kollagen keinen Einfluß haben.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Bakterienstamm aus der Gattung *Achromobacter* hinsichtlich seiner fraglichen Eigenschaften gegenüber nativem Kollagen sowie dem synthetischen Pentapeptid näher geprüft werden.

Der Stamm wurde wiederholt in Kollagenaufarbeitungen gefunden, und zwar in reiner Form, so daß der Gedanke an eventuelle kollagenolytische Aktivität nahe lag. Die Keime wurden am Max-von-Pettenkoferinstitut für Hygiene und Med. Mikrobiologie (München, Pettenkoferstr. 9a) untersucht. Es handelte sich um einen einheitlichen Stamm.

Mikroskopisch zeigten sich Gram-negative kokkoide, plumpe Stäbchen. Kolonien auf Agar erschienen rund, konvex, grauweiß und durchscheinend, nach Tagen grau, undurchsichtig und glattrandig. In Nährlösungen erfolgt wolkiges Wachstum an der Oberfläche mit körnigem Niederschlag. Die Stoffwechselleistungen seien tabellarisch zusammengefaßt:

1 Kligler	- 15 Dulcit	- 29 Natriummalonat	-
2 Dextrose	- 16 Salicin	- 30 Natriummucic	-
3 Laktose	- 17 Raffinose	- 31 Phenylalanin-desaminase	-
4 Mannit	- 18 Cellobiose	- 32 Lysin-decarboxylase	+
5 Saccharose	- 19 Methylrot	- 33 Arginin-dehydrolase	+
6 Xylose	- 20 Glycerin	- 34 Ornithin-decarboxylase	+
7 Maltose	- 21 Urease	- 35 H ₂ S	-
8 L-Arabinose	- 22 Simmons-Citrat	- 36 Glutaminsäure-decarboxylase	+
9 L-Rhamnose	- 23 Nitratreduktion	- 37 Citrat	-
10 Adonit	- 24 Voges-Proskauer	- 38 D-Tartrat	-
11 D-Sorbit	- 25 Gelatine	+ 39 Oxidase	-
12 Inosit	- 26 Indol	- 40 Katalase	+
13 L-Sorbose	- 27 KCN-Test	+	
14 Trehalose	- 28 Phenylglyoxal-Säure	-	

Auf Grund dieser Befunde wurde der Stamm der Gattung *Achromobacter* der Familie *Achromobacteriaceae* zugeordnet, wobei man berücksichtigen muß, daß in diesem Bereich in der Bakteriennomenklatur große Uneinigkeit herrscht, da Literatur erst in spärlichem Maße vorliegt. Das mag an der bislang geringen pathogenetischen Bedeutung dieser Mikroorganismen liegen. In letzter Zeit wurden allerdings unter immunsuppressiver Behandlung, wie sie etwa bei Transplantationen vorgenommen wird, Fälle bekannt, wo bedrohliche Infektionen auf solche Keime zurückgeführt werden konnten (Ruckdeschel, G., 1970). Eine eingehende Untersuchung dieser Gruppe erscheint also auch in diesem Lichte interessant.

A u f g a b e n s t e l l u n g

In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, ob ein aus Kollagenaufarbeitungen isolierter Stamm der Gattung *Achromobacter* ähnliche kollagenolytische Eigenschaften zu entwickeln vermag, wie sie an Clostridien eindrucksvoll nachgewiesen werden konnten.

Als Substrat sollte in Analogie zur Clostridienpeptidase A neben nativem Kollagen auch das synthetische Modellpeptid PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg, das eine Sequenz der apolaren Bereiche des Kollagenmoleküls darstellt, Verwendung finden.

Gegebenenfalls sollte eine kurze Charakterisierung der gefundenen Aktivitäten erfolgen.

Im Falle einer Spaltung des Modellpeptids sollte untersucht werden, ob dieses Substrat grundsätzlich geeignet ist, als Indiz für echte Kollagenaseaktivität herangezogen zu werden.

ERGEBNISSE

I. Suche nach dem optimalen Nährmedium

1. Vorbemerkungen

Zunächst galt es, ein Nährmedium zu finden, das sowohl optimales Wachstum wie auch maximale Enzymaktivitäten ermöglichen konnte. Dazu kurz einige generelle Anmerkungen.

a) Bakteriellcs Wachstum:

Werden ruhende Bakterien auf geeignete Nährmedien übertragen, so beginnt damit die in mehrere Phasen aufteilbare Entwicklung der neuen Kultur.

In der ersten Phase nach der Überimpfung tritt noch keine Vermehrung ein. Die überimpften Bakterien zeigen lediglich eine Volumenzunahme, eine in diesem Stadium auftretende Differenzierung des Cytoplasmas in dichte und weniger dichte Zonen steht im Zusammenhang mit der Zunahme und Verteilung der Nucleinsäuren. Dieser erste Schritt der Kultur wird als *Latenzphase* bezeichnet. Er dient der Vorbereitung auf die Zellteilung und der Adaption an das neue Zellmilieu. Seine Dauer ist abhängig von der Bakterienart, der Qualität des Nährbodens, beziehungsweise der Gewöhnung der Bakterien an diesen Nährboden, ferner von der Temperatur und der Anzahl der überimpften Keime, da sich eine große Menge schneller an die neue Umgebung gewöhnt als vereinzelt Individuen.

Nach Überwindung der Phase der Latenz beginnt das Stadium der Zweiteilung, die *logarithmische Wachstumsphase*. Unter günstigen Bedingungen können die Zellteilungen in Zeitabständen von 15 - 30 Minuten erfolgen.

Die logarithmische Wachstumsphase wird begrenzt durch den Verbrauch wichtiger Nährstoffe und die Anhäufung schädigender Stoffwechselprodukte. Durch eine teilweise oder vollständige Erneuerung des Nährsubstrates gelingt es, eine Bakterienkultur über beliebig

lange Zeit in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten.

Andernfalls kommt es zu einem Vermehrungsstillstand. Die Kultur geht in die Ruhephase über, in der sich vereinzelter Zellteilungen und Absterbevorgänge die Waage halten, bis nach Stunden oder Tagen letztere überwiegen und die Kultur langsam in die Absterbephase gleitet.

b) Enzymproduktion der Bakterien

Um lebensfähig zu sein und Stoffwechsel betreiben zu können, sind die Bakterien mit einem mehr oder weniger komplizierten Enzymapparat ausgerüstet. Da hochmolekulares Substrat nicht durch die Zellmembran ins Cytoplasma eindringen kann, bedarf es der Ausscheidung von Enzymen ins Medium, um Spaltprodukte zu erhalten, die dann ins Zellinnere dringen und dort von anderen Enzymen weiterverarbeitet werden können. Aus der Lokalisation leitet sich die Klassifizierung in Exo- und Endoenzyme ab.

Endoenzyme werden nur dann im Nährmedium nachweisbar sein, wenn ihnen eine defekte Zellwand den Austritt aus dem Mikroorganismus erlaubt. Dieser Fall tritt beim natürlichen Zelltod ein, künstlich kann er herbeigeführt werden durch Beschallung, Frieren und Tauen, Enzymeinwirkung und bestimmte mechanische Behandlung.

Will man Enzymaktivitäten, ermittelt aus der Nährlösung einer Kultur, zeitlich der Wachstumskurve zuordnen, so wird man, handelt es sich um Exoenzyme, finden, daß parallel zur Zahl der lebenden Keime die Aktivität ansteigt und abfällt. Dabei kann das Maximum der Aktivitätskurve etwas hinter dem der Wachstumskurve liegen, wenn im Falle eines sehr stabilen Enzyms die Totalaktivität noch zunimmt, während die Keime bereits die Ruhephase erreicht haben.

Betrachten wir ein Endoenzym, so liegt es auf der Hand, daß die Aktivitätskurve ihren Gipfel erst dann erreicht, wenn die Zellen in der Absterbephase stehen und ihr Inneres frei wird.

Hohe Keimzahl muß nicht immer auch hohe Produktion eines Enzyms bedeuten. Es ist bekannt, daß in Bakterien nicht alle Enzyme ständig produziert werden. Nur die sogenannten konstitutiven Enzyme stehen immer zur Verfügung, unabhängig vom Milieu, während andere adaptiv Enzyme nur dann, zumindest meßbar, vorhanden sind, wenn sie die Zelle auch benötigt, d.h. wenn die Zelle zum

Abbau eines bestimmten Substrates gezwungen ist, das nur durch ein solches adaptives Enzym bewältigt werden kann. Bietet man dieses Substrat an, so kann die Synthese dieses Enzyms rasch auf ein Vielfaches gesteigert werden, eine Induktion hat stattgefunden.

2. Methodik

a) Nährmedien

Es wurden sieben Medien ausgetestet. Die genaue Zusammensetzung ist im experimentellen Teil dieser Arbeit (Versuch 1) nachzulesen.

Die Medien 1 - 5, nämlich Thioglycolat, Caseinpepton, Yeastolat, Bactopepton und Tarozzi, sind in der Bakteriologie mehr oder weniger üblich.

Medium 6 wurde analog einer Gewebekultur von Mäusehaut hergestellt, da *Achromobacter*-keime in solchen Kulturen wiederholt gefunden worden waren und an einen Zusammenhang zwischen dem Kollagen der Haut und dem Wachstum der Mikroorganismen gedacht worden war. Selbstverständlich mußten die Ansätze zum Zwecke der Bakterienzüchtung autoklaviert werden.

Medium 7 stellt den Versuch dar, eventuelle kollagenolytische Enzyme zu induzieren. Deshalb wurde hier der Peptongehalt niedrig gehalten und dafür steril filtrierte, natives Kalbshautkollagen zugesetzt.

Bei allen Medien war die Inkubationstemperatur 37°C.

b) Verfolgung des Wachstums

Da es sich bei der Suche nach dem optimalen Nährmedium zunächst ja nur um grobe Orientierung handelte, wurde das Wachstum der Kulturen mit freiem Auge nach dem Trübungsgrad beurteilt.

c) Vorbereitung der Proben

Um mit Sicherheit Aktivität sowohl in exo- als auch in endoenzymatischer Form zu erfassen, wurden den Kulturen täglich aliquote Mengen entnommen, zentrifugiert, der Überstand abgekippt und der enzymatischen Bestimmung unterzogen. Der Niederschlag, der von den Zellen gebildet wurde, wurde in neutralem Tris-HCl-Puffer resuspendiert,

2 - 3 mal gefroren und wieder getaut und anschließend einer 30 x 1-minütigen Beschallung ausgesetzt (Versuch 2, exp. Teil). Unter dieser Behandlung wurden die Zellmembranen gesprengt, wie sich im Mikroskop nachweisen ließ. Daneben zeigt sich auch, daß bei der nun noch folgenden klärenden Zentrifugation, die in gleicher Weise wie die erste durchgeführt wurde, weitaus weniger Material sedimentierte, was gleichfalls bedeutet, daß die einzelnen Organismen offenbar in leichtere Untereinheiten zerschlagen worden waren.

Nachdem also aus den zerstörten Zellen eventuelle Endoenzyme in die Suspensionslösung gedungen waren, wurde die letztere ebenfalls einer enzymatischen Analyse unterzogen.

d) Enzymbestimmung

Zur Prüfung einer fraglichen kollagenolytischen Aktivität wurden zwei Substrate gewählt, die wie oben beschrieben, bei Untersuchungen bakterieller Kollagenasen Verwendung gefunden hatten: natives Kalbshautkollagen, hergestellt nach einer von Engel (Engel, J., 1962) modifizeirten Vorschrift von Gallop (Gallop, P.M., 1955), sowie das synthetische Pentapeptid PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg (Wünsch, E. und Heidrich, H.G., 1963), wobei die Spezifität des Kollagenmodellpeptids selbstverständlich offen blieb.

α) Abbau nativen Kollagens

Enzymatische Abbauvorgänge am nativen Kollagen wurden in Anlehnung an Gross (Gross, J. und Nagai, Y., 1965) viskosimetrisch bei pH 7,5 verfolgt. Bekanntlich wird die Viskosität einer Lösung durch die Störung bestimmt, die ein gelöstes Teilchen in der laminaren Strömung des Lösungsmittels verursacht. Im Falle des Fadenmoleküls Kollagen nimmt das Ausmaß dieser Störung und damit die Viskosität der Lösung ab, wenn das Molekül durch Spaltung verkürzt wird. Nachweisbar wird dies, indem man die Durchlaufzeiten der Lösung durch eine Glaskapillare (Viskosimeter) bestimmt und daraus die Viskosität berechnet (Versuch 3, exp. Teil).

Bei den vorliegenden viskosimetrischen Versuchen wurde Pufferlösung, Enzymlösung und Kollagenlösung so gemischt, daß das Kollagen im Reaktionsgemisch in einer Endkonzentration von etwa 0,1% vorlag. Inkubiert und gemessen wurde bei konstanter Temperatur von +20°C (Versuch 3, exp. Teil). Inkubationen oberhalb dieser Temperatur

sind fragwürdig, da lösliches Kollagen dann auch einem unspezifischen proteolytischen Abbau gegenüber nicht mehr inert ist (Kühn, K. u.a., 1966). Aus den gemessenen Durchlaufzeiten wurde η_{sp} (spez. Viskosität) berechnet. Die spezifische Viskosität zum Zeitpunkt 0, also sofort nach der Vereinigung von Enzym und Substrat wurde gleich 100% gesetzt und die in der Folgezeit ermittelten η_{sp} prozentual darauf bezogen. Dieses Verfahren erlaubt einen Vergleich der verschiedenen Versuche.

Zur Kontrolle wurde Kollagenlösung mit Trypsin (Enzym-Substrat-Verhältnis 1:10) und Kollagenlösung ohne jeden Enzymzusatz in der gleichen Weise gesetzt. Im Polarimeter wurde unter den selben Bedingungen die Änderung der optischen Drehung des Substrates ohne Trypsin verfolgt, um eine Denaturierung während der Prozedur ausschließen zu können.

War aus den viskosimetrischen Messungen durch Erniedrigung der Viskosität auf einen Kollagenabbau zu schließen, so wurden die Reaktionsprodukte ausgefällt und mittels Diskelektrophorese im Reisfeldgel (Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., Williams, D.E., 1962) aufgetrennt (Versuch 4, exp. Teil).

Die analytische Diskelektrophorese hat sich in immer stärkerem Maße als außerordentlich empfindliche Methode zur Auftrennung und quantitativen Analyse komplexer Proteingemische in der Biochemie bewährt. Dabei erreicht man eine Trennung sowohl durch Elektrophorese als auch durch einen "Molekularsiebeffekt" des verwendeten Polyacrylamidgels, welcher durch Steuerung des Vernetzungsgrades und somit der Porenweite des Gels in weiten Grenzen variierbar ist. Wesentlich ist die Einführung eines diskontinuierlichen Puffersystems, welches den sogenannten "Konzentrierungseffekt" (Ornstein, L., 1964) erzeugt. Danach werden Proteine vor ihrer Auftrennung in einem durch besondere pH- und Porenverhältnisse gekennzeichneten Gel zu scharfen Zonen konzentriert. Anschließend werden sie in einem stärker vernetzten Gel in Abhängigkeit von ihren Moleküldimensionen und ihren freien Ladungen elektrophoretisch aufgetrennt.

β) Spaltung des synthetischen Substrates

Der Austestung mittels des Pentapeptids als Substrat liegt folgendes Prinzip zu Grunde (Versuch 5, exp. Teil): durch Spaltung wird

das Bruchstück PZ - Pro - Leu frei, das nach Ansäuerung seine Wasserlöslichkeit verliert und in eine organische Phase ausgeschüttelt werden kann. Darin läßt es sich dann colorimetrisch durch die chromophore Gruppe PZ nachweisen (Wünsch, E. und Heidrich, H.G., 1963).

3. Befunde

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse dieses Abschnittes noch einmal zusammengefaßt. Spalte 1 zählt die Medien auf, die jeweils nach Beimpfung 5 Tage lang (Spalte 2) hinsichtlich ihres Wachstums (Spalte 3), ihrer kollagenolytischen Aktivität (Spalte 4 u. 5), sowie ihrer Aktivität gegenüber dem synthetischen Substrat (Spalte 6 u. 7) geprüft wurden. Spalte 5 und 7 geben die Aktivitäten der Zellaufschlüsse (Frieren, Tauen, Beschallen) an.

Dabei bedeutet + geringes Wachstum
 ++ mittleres Wachstum
 +++ starkes Wachstum

Wie Tabelle 1 zeigt, bieten Medium 1, 2 und 5 eindeutig die günstigsten Wachstumsbedingungen. Hier finden sich auch die höchsten Spaltungsraten am synthetischen Substrat. Umgekehrt wird in den Medien mit geringem Wachstum nur mäßiger PZ-Penta-Abbau beobachtet. Offenbar besteht eine Parallelität zwischen Keimzahl und dieser Peptidaseaktivität.

Ein völlig anderes Bild zeigt die viskosimetrische Austestung der Medien. Signifikante Abbauerfolge am natürlichen Substrat, dem nativen Kollagen, sind nur mit Medium 6 und 7 zu verzeichnen. Paradoxerweise fehlt analoge enzymatische Aktivität in Medium 1, 2, und 5, die das stärkere Wachstum aufzuweisen haben.

In Abb. 1 ist die viskosimetrische Verfolgung des Kollagenabbaus mit Mäusehautmedium (Medium 6) graphisch dargestellt. Die mitgeführte Trypsinkontrolle (Enzym-Substratverhältnis 1:10) beweist, daß das Kollagen unter diesen Bedingungen unspezifischen proteolytischen Abbau gegenüber weitgehend unempfindlich ist. Die anschließenden diskoelektrophoretischen Auftrennungen unterstreichen die viskosimetrischen Ergebnisse. Die Spaltung des Substrates durch Medium 6 kommt in der Vielzahl der Banden nach der Trennung zum Ausdruck.

Tabelle 1: Untersuchungen zur Bestimmung des optimalen Mediums (s. Kap. I.1.3)

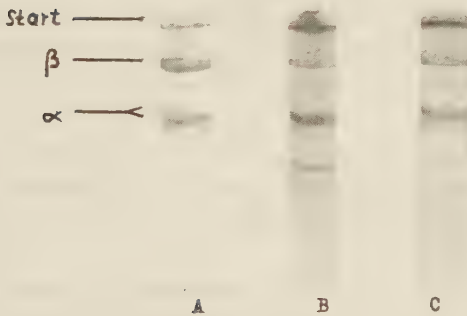
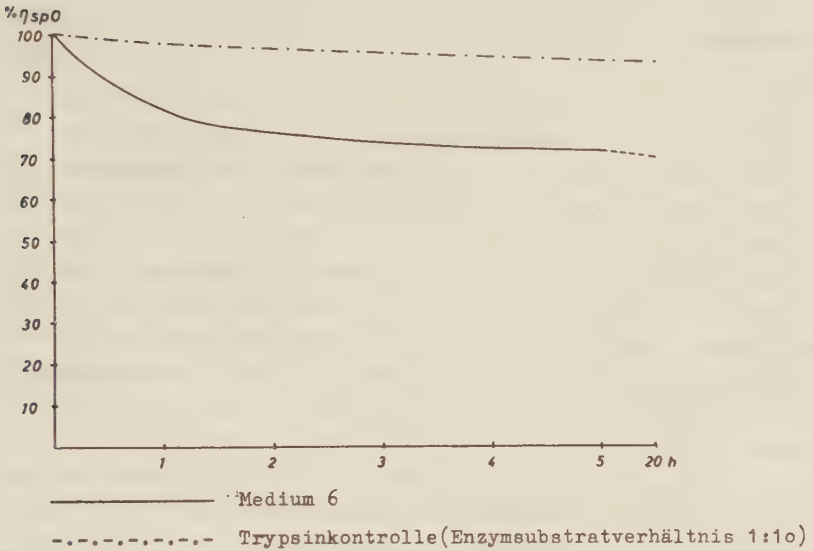
Medium	Tag nach Beimpfung	Wachstum	Kollagenolytische Aktivität (Viskosimetrie, 100%igp zur Zeit 0) vor Zellaufschluß nach Zellaufschluß	Peptidaseaktivität (P2-Pro-Leu/2h) vor Zellaufschluß nach Zellaufschluß
1. Thio- Glycolat	1	(+)	100	0
	2	+	95	8
	3	++	96	50
	4	++	95	10
	5	++	96	12
2. Casein- pepton Yeastolat	1	-	100	0
	2	+	98	10
	3	++	100	48
	4	++	95	8
	5	++	95	11
3. Yeastolat + Serum	1	-	98	0
	2	+	95	8
	3	+	92	15
	4	+	96	20
	5	+	98	22
4. Bacto- pepton	1	-	100	0
	2	+	96	3
	3	+	98	16
	4	+	96	9
	5	+	95	20
5. Tarozi	1	+	99	0
	2	+	95	10
	3	++	90	52
	4	++	98	11
	5	++	96	10
6. Wause- haut	1	-	99	0
	2	(+)	98	2
	3	+	84	0
	4	+	74	10
	5	+	75	18
7. Kollagen- medium	1	-	100	0
	2	+	95	1
	3	+	88	9
	4	+	76	5
	5	+	79	7

Nicht bakterielle enzymatische Aktivitäten können mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da die Haut vor der Beimpfung beim Sterilisieren Temperaturen von über 200°C ausgesetzt war.

Die obigen Befunde erlauben die Vermutung, daß mit den angebotenen Substraten zwei nicht identische Enzyme erfaßt wurden. Daneben besteht ein Hinweis, daß die Bildung der kollagenolytischen Aktivität der Stimulation durch Kollagen nativer (Medium 7) oder denaturierter (Medium 8) Form bedarf.

Durch die folgenden elektrophoretischen Versuche sollten diese beiden Annahmen gestützt werden.

Abb.1:viskosimetrische Verfolgung des Kollagenabbaus mit Medium 1(oben)sowie Auftrennung des Reaktionsgemisches in der Diskelektrophorese (unten).



A: Kontrolle ohne Enzym
B: Abbau mit Medium 6
C: Trypsinkontrolle

II. Nachweis einer Peptidase und eines kollagenolytischen Enzyms

1. Methodik

a) Züchtung

Für die Versuche zur Auftrennung zweier vermuteter Enzymsysteme wurden diejenigen Medien zur Züchtung gewählt, die jeweils die höchsten Enzymaktivitäten entwickelt hatten, nämlich Medium 1,6 und 7 (s. Tab.1),

Die Züchtung erfolgte in großen Gewebekulturflaschen bei Raumtemperatur, da mit Inkubationen bei 37°C kein schnelleres Wachstum erzielt werden konnte. Um eine möglichst rasche Vermehrung der Keime zu gewährleisten, wurde die Beimpfung mit flüssigen Kulturen vorgenommen, die etwa vom Ende der logarithmischen Phase stammten (Versuch 6, exp. Teil).

Auf Blutagarplatten wurden sowohl der überimpfte Stamm als auch die Tochterkulturen hinsichtlich ihrer Identität und Homogenität geprüft (Versuch 7, exp. Teil).

Täglich wurden Proben steril den Flaschen entnommen, viskosimetrisch und mittels PZ - Substrat ausgetestet. Hatten die Aktivitäten ihr Maximum erreicht, was ungefähr am 3.-5. Tag der Fall war, wurden die Kulturen verarbeitet.

b) Einengung der Medien

Zunächst wurden die Medien durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 1000 x g und Filtration durch 0,2 µ Bakterienmembranen (Sartorius) von den Keimen befreit.

Anschließend mußten die großen Volumina zur weiteren Aufbereitung eingeengt werden. Dies wurde durch Ultrafiltration an der Sartorius-Apparatur, sowie im Diaflo-Gerät der Amicon Corporation erreicht.

Die Sartorius-Apparatur wurde aus praktischen Erwägungen gewählt, da hiervon mehrere Exemplare zur Verfügung standen und somit rasch im gleichen Arbeitsgang größere Mengen von Nährlösungen gewälzt werden konnten. Dabei stellte sich heraus, daß ein wesentlicher Teil des braunen Pigments, das sich aus den Peptonen

der Medien zusammensetzte, durch die Sartoriusmembranen (molekulare Trenngrenze 10 000 Molekulargewicht) hindurchdringen kann. Somit bedeutet diese Ultrafiltration einen Anreicherungsverfahren (Versuch 8, exp. Teil). Vor der Trennung wurden die Lösungen noch weiter an der Amicon-Apparatur eingeeengt, die eine höhere Konzentrierung ohne wesentliche Verluste erlaubt.

c) Trennung mittels trägerfreier Elektrophorese

Die Auftrennung der Konzentrate wurde in der kontinuierlichen, trägerfreien Elektrophorese nach Hannig (Hannig, K., 1964) durchgeführt. Die Apparatur hatte sich bereits bei der Reinigung von Kollagenase aus Clostridien (Grassmann, W., Strauch, L. und Nordwig, A., 1963), sowie anderen Enzympräparationen bewährt (Mehl, E. und Jatzkewitz, H., 1964), (Nordwig, A., Dehm, P. und Jahn, W.F., 1967), (Nordwig, A. und Jahn, W.F., 1968).

Im Prinzip strömt quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes eine Pufferlösung, der das zu trennende Gemisch kontinuierlich zugeführt wird. Die Komponenten mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit werden entsprechend abgelenkt und können an verschiedenen Stellen nach Verlassen der Apparatur entnommen werden. Hervorzuheben ist, daß mit dieser kontinuierlich arbeitenden Methode im Gegensatz zur Säulenchromatographie große Proteinmengen in relativ kurzer Zeit aufgetrennt werden können, was vor allem bei Vorreinigungen nützlich ist.

Als Puffer diente Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, unter Zusatz von Ca-Acetat. Die Ca-Ionen sollten eine Stabilisierung oder Aktivierung der Enzyme bewirken (Versuch 9, exp. Teil).

d) Enzymbestimmungen

Da eine viskosimetrische Austestung der einzelnen Fraktionen nach der elektrophoretischen Trennung zeitlich sehr aufwendig ist und auch höheren Ansprüchen auf eine genaue quantitative Aussage nicht genügen kann, mußte eine rationellere und empfindlichere Methode für die Prüfung der kollagenolytischen Aktivität gefunden werden. Hierzu bot sich eine bereits von Gross und Mitarbeitern (Nagai, Y., Lapiere, C.M. und Gross, J., 1966) praktizierte Arbeitsweise an:

¹⁴C-markiertes, lösliches Kollagen wird in den Gelzustand überführt

und mit Enzymlösung versetzt. Durch enzymatischen Abbau in Lösung gebrachtes Kollagen läßt sich dann durch scharfe Zentrifugation vom unlöslichen Gelanteil scheiden und kann im Szintillationszähler gemessen werden. Prinzipiell läßt sich der gleiche Arbeitsgang auch mit nicht markiertem Kollagen durchführen, indem man die Konzentration des abgespaltenen Kollagens im Überstand durch eine Hydroxyprolinbestimmung ermittelt (Versuch 10,13, exp. Teil).

Da radioaktives Kollagen nicht käuflich ist, wurde die Herstellung selbst vorgenommen. Zu diesem Zwecke wurden wachsende Meeresschweinchen mit ^{14}C -markiertem Glycin gespritzt. Glycin macht bekanntlich etwa 30% der Aminosäurezusammensetzung des Kollagens aus, so daß eine hohe Markierung zu erwarten war. Jungtiere wurden deshalb verwendet, weil der Anteil an extrahierbarem Kollagen hier größer ist als bei älteren Tieren.

Nach Ablauf einer Latenzzeit, in der der Einbau der markierten Aminosäure sein Maximum erreicht hatte, wurden die Tiere getötet und aus der Haut neutralsalzlösliches (NLK) und säurelösliches (SLK) Kollagen extrahiert (Versuch 10, exp. Teil). Der Zeitpunkt des Tötens wurde so gewählt, daß die spezifische Aktivität des NLK am Höhepunkt angelangt sein mußte. Läßt man ihn verstreichen, so wandert die Radioaktivität in die säurelöslichen und zugleich auch in die unlöslichen Kollagenfraktionen ab. Entscheidend ist nämlich, daß NLK im Körper nicht nur in SLK, sondern auch unmittelbar in unlösliches Kollagen überführt wird und sich somit einer Extraktion entzieht (Jackson, D.S., 1957).

Bei den Aufarbeitungen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Spezifische Aktivität NLK	10 700 cpm
Spezifische Aktivität SLK	200 - 670 cpm (drei Extraktionen)

Unter spezifischer Aktivität wird die Zahl der Lichtblitze pro Minute verstanden, die durch den radioaktiven Zerfall eines Milligramms Kollagen hervorgerufen werden.

Die Gewichtsbestimmungen erfolgten durch Einwaage des gefriergetrockneten Materials. Für die enzymatischen Versuche wurde NLK und SLK so vereinigt, daß ein Gemisch mit einer spezifischen Aktivität von 1700 cpm entstand.

Um die Widerstandsfähigkeit der Gele gegenüber unspezifischen

proteolytischem Angriff zu prüfen, wurden Kontrollen mit kristallinem Trypsin durchgeführt (Enzym-Substratverhältnis 1:10). Die Inkubationszeit betrug hier wie bei allen weiteren ^{14}C -Kollagenabbauversuchen 6 Stunden. Um eine größere Genauigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Proben im Scintillator 10 Minuten (cp10m) ausgezählt.

Die Spaltungsraten wurden prozentual auf die pro Ansatz enthaltene Totalaktivität bezogen, nämlich auf 17 000 cp10m entsprechend 1 mg Kollagen. Nachdem nach Abzentrifugieren des Geles nur 0,4 ml des Überstandes aus einem Gesamtvolumen von 1,0 ml zur Zählung gelangten (Versuch 10), mußten die Zählergebnisse mit dem Faktor $\frac{5}{2}$ multipliziert und damit auf 1,0 ml umgerechnet werden. Dies sei am Beispiel des Trypsinabbaus demonstriert.

Die mitgeführte Blindprobe enthält an Stelle der Enzymlösung nur Puffer.

Totalaktivität des Geles	17 000 cp10m	= 100%
Aktivität in 0,4 ml Überstand der Trypsinprobe	1004 cp10m 1036 cp10m (Doppelbest,)	1020 cp10m
Aktivität in 0,4 ml Überstand der Blindprobe	675 cp10m 689 cp10m (Doppelbest.)	682 cp10m
Wahre Spaltung in 0,4 ml Überstand durch Trypsin	1020 cp10m - 682 cp10m	= 338 cp10m
Spaltung pro Gesamtvolumen	338 cp10m x $\frac{5}{2}$	= 845 cp10m
Trypsinabbau in % der Totalaktivität		4,9%

Die Genauigkeit der Methode wird aus den Doppelbestimmungen ersichtlich.

Neben der Austestung mit radioaktivem Kollagen wurde weiterhin die Spaltung des synthetischen Substrates untersucht.

Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung unspezifischer proteolytischer Aktivität nach der Methode von Kunitz (Kunitz, M., 1947). Dabei wird Casein mit Enzymlösung inkubiert und das nicht abgebaute hochmolekulare Substrat mit Trichloressigsäure ausgefällt und abzentrifugiert. Im Überstand lassen sich die Abbauprodukte durch Messung der Absorption bei 280 m μ quantitativ nachweisen (Versuch 11, exp. Teil).

2. Befunde

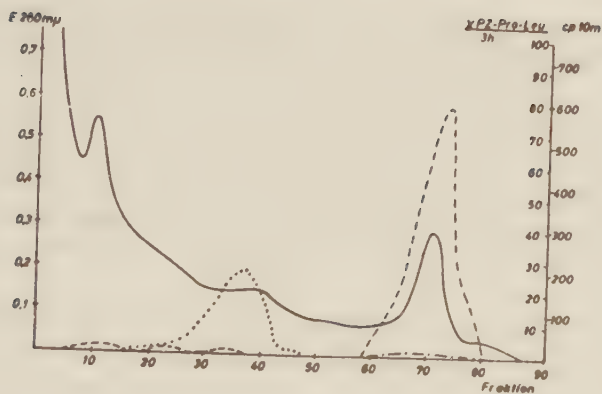
In Abb. 2 sind die elektrophoretischen Auftrennungen von Medium 1, 6 und 7 graphisch einander gegenübergestellt.

Als Maßstab für den Proteingehalt der Fraktionen, sowie der caseinolytischen Aktivität diente die Extinktion, gemessen bei 280 m μ . Die Einheiten sind an der linken Ordinate aufgetragen.

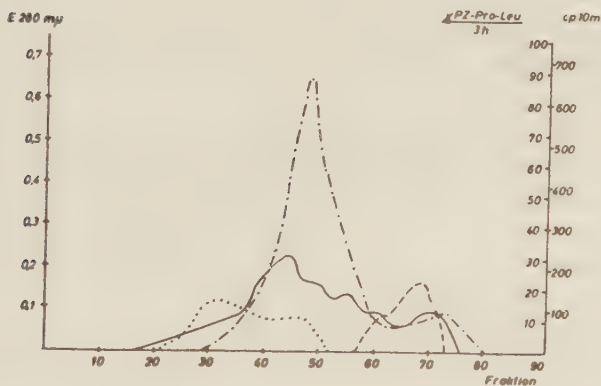
Die rechte Ordinate zeigt die Einheiten der PZ-Pentaspaltung, nämlich PZ - Pro - Leu, und die des ^{14}C -Kollagenabbaus. Die radioaktiven Proben wurden jeweils 10 Minuten lang ausgezählt (cp 10m = counts per 10 minutes).

Abb. 2: Auftrennung von Medium 1, 6 und 7 (von oben nach unten) durch trägerfreie Elektrophorese.

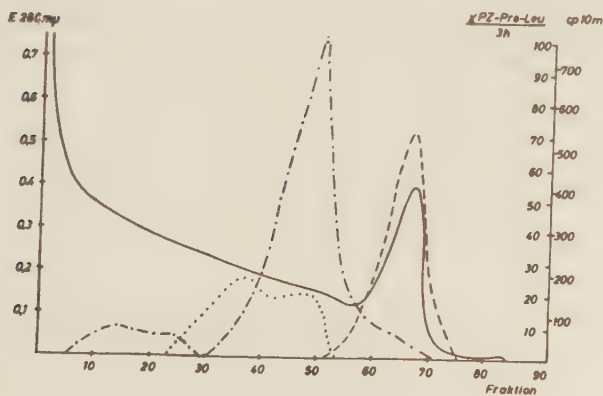
—————	E _{280 mμ}
.....	Casein
-----	PZ-Spaltung
-. - -. - . - . - .	^{14}C -Kollagenspaltung



Medium I



Medium 6



Medium 7

Die Inkubationszeiten erstreckten sich bei den radioaktiven Testen über 6 Stunden, bei der PZ-Substratspaltung über 3 Stunden.

Betrachtet man die Proteinverteilung der einzelnen Diagramme (—), so imponiert bei der Auftrennung des Thioglycolatmediums (Medium 1), sowie des Kollagenmediums (Medium 7) ein anodennaher hoher Gipfel, der von den restlichen Peptonen der Lösungen her-rührt. Die Fraktionen in diesem Bereich weisen eine bräunliche Pigmentierung auf.

Unterhalb der Einspritzstelle (Fraktion 70) folgt ein kleiner Nebenpeak, der wohl auf die Anhäufung von isoelektrischem Material zurückzuführen ist.

Ein davon abweichendes Bild zeigt die Proteinkurve des Mäusehautmediums. Entsprechend seiner anderen Zusammensetzung kommt ein Verlauf zur Darstellung, der einer Serumauftrennung ähnelt.

In allen Medien findet PZ-Substrat-Spaltung statt (----). Ihr Maximum liegt einheitlich zwischen Fraktionen 63 und 73.

Davon deutlich abgesetzt trifft man bei der Verfolgung der ^{14}C -Kollagenkurven (-.-.-) in Medium 6 und 7 auf einen Gipfel, der den Fraktionen 40 - 50 zugeordnet werden kann. In Medium 7 werden etwa 11% der Totalradioaktivität abgebaut.

Auffällig ist das Fehlen einer analogen Aktivität in Medium 1.

Caseinspaltung kommt zwar in allen Versuchen vor, ist jedoch erstaunlich gering ausgeprägt. Es erscheint jeweils ein Hauptgipfel im Bereich von Fraktion 30 - 40. In Medium 6 und 7 schließt sich daran noch eine Schulter an, die unter den ^{14}C -Gipfel zu liegen kommt. Setzt man die Werte dieser Schulter in eine Eichkurve ein, die die Caseinspaltung in Abhängigkeit von der Konzentration reinen Trypsins darstellt (Versuch 11, exp. Teil), so findet man, daß die proteolytische Aktivität etwa der von 10^{-8} Trypsin entspricht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Spaltung des nativen Kollagens und des Modellpeptides auf die Tätigkeit zweier verschiedener

Enzyme zurückzuführen ist.

Bemerkenswert ist, daß die Fraktionen, die Kollagengele anzugreifen vermögen, nicht ganz frei von unspezifischer Proteasewirkung sind. Eine Nachtrennung dieses Bereiches zur weiteren Differenzierung war nicht möglich.

Geht man von der Voraussetzung aus, daß die sich überschneidende kollagenolytische und unspezifisch proteolytische Aktivität die Wirkung eines einzigen Enzymes widerspiegeln, so muß man dieses nach der eingangs zitierten Definition als kollagenolytisches Enzym bezeichnen. Verglichen mit 100% Trypsin, entwickelt es mehr als die doppelte Aktivität am ^{14}C -Kollagen (11% gegenüber 5%), seine Spaltung am Casein entspricht nur einer solchen von etwa 10% Trypsin.

Das Fehlen kollagenolytischer Aktivität in Medium 1 sowie ihr Auftreten in den Medien 6 und 7 deckt sich mit der An- und Abwesenheit von Gelatine bzw. Kollagen in den Nährlösungen. Auf Grund dieser Tatsachen könnte man an eine Induzierbarkeit des kollagenolytischen Enzyms durch diese Zusätze denken. Eine Hemmung des Enzyms durch den Gehalt an Thioglycolat und Cystein, wie er nur in Medium 1 vorliegt, ist auszuschließen, da nach Tabelle 1 auch die Medien 2 - 5 keinen Kollagenabbau zeigen.

Im Bereich der PZ-Substrat-Spaltung wird ein signifikanter Kollagenabbau vermißt. Es war zu untersuchen, ob nicht mit höheren Konzentrationen des hier vorliegenden Enzyms, das im folgenden als *P e p t i d a s e* bezeichnet werden soll, auch ein Angriff an den apolaren Sequenzen des natürlichen Substrates zu erzielen ist. Dazu war eine weitere Reinigung des Enzyms erforderlich.

III. Das kollagenolytische Enzym. Nähere Charakterisierung.

Als Material für die folgenden Versuche dienten die vereinigten Fraktionen 48 - 52 aus der elektrophoretischen Auftrennung von Medium 7.

1. Kollagenabbau in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Um einen Nachweis für die Existenz eines echten Enzyms zu erbringen, wurde eine Verdünnungsreihe der Fraktionen hergestellt und bei 37°C mit nicht radioaktiven Kollagengelen 6 Stunden inkubiert. Die Durchführung der Bestimmung geschah analog der ¹⁴C-Kollagenaustestung. Als Maßstab für die kollagenolytische Aktivität diente das aus den Gelen freigesetzte Hydroxyprolin im Überstand. Auf diese Methode mußte übergegangen werden, da der Bestand an markiertem Kollagen aufgebraucht war. Die Hydroxyprolinbestimmung wurde nach Stegemann (Stegemann, H., 1958) durchgeführt (Versuch 13, exp. Teil).

Das Prinzip: Die von unabgebautem Kollagen abzentrifugierten Proben werden in Salzsäure hydrolysiert, die Säure abgedampft. Nach Zugabe von Wasser und Adsorption störender Farbstoffe an Aktivkohle erfolgt mittels Chloramin-T (p-Toluolsulfonchloramidnatrium) die Umwandlung des Hydroxyprolins in Pyrrol. Letzteres kann mit p-Dimethylaminobenzaldehyd colorimetrisch nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle, ob noch größere Mengen Kollagen aus dem Medium enthalten waren, mußten Blindversuche mitgeführt werden. Zu diesem Zwecke wurde der ganze Ansatz parallel in gleicher Weise, jedoch unter Überspringen der Inkubation durchgeführt.

In Abb. 3 erkennt man die Linearität zwischen Enzymkonzentration und Kollagenabbau.

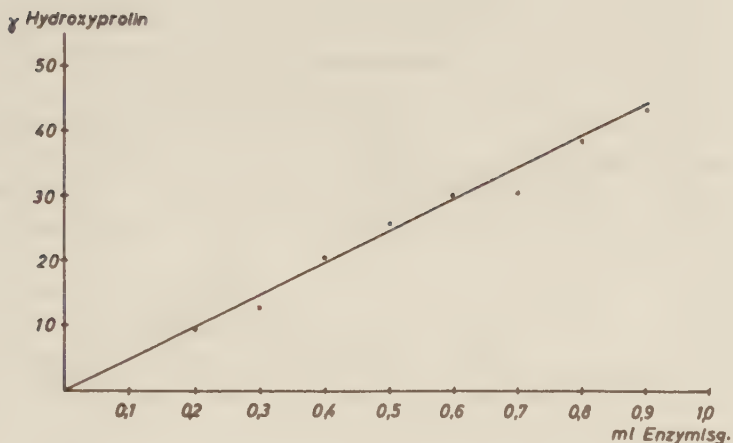


Abb. 3: Die Freisetzung von Hydroxyprolin aus Kollagengel in Abhängigkeit von der Konzentration des kollagenolytischen Enzyms (Inkubation 6h, 37°C).

2. Vergleich mit Clostridienpeptidase

a) Viskosimetrie

Zunächst wurde versucht, die Reaktion des kollagenolytischen Enzyms solange im Viskosimeter zu verfolgen, bis ein Stillstand eingetreten war. Dieser Fall trat ein, nachdem die spezifische Viskosität auf etwa 70% des Wertes zur Zeit 0 reduziert worden war (Abb.4). Um nachzuweisen, daß der ausbleibende weitere Abbau nicht etwa die Folge einer mangelhaften Stabilität des Enzyms sei, wurde erneut Enzymlösung zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Dabei tritt selbstverständlich eine Verdünnung des Viskositätsansatzes ein, der als Stufe im Diagramm zum Ausdruck kommt. Wesentlich ist, daß der weitere Verlauf keinen erneuten Abfall von η_{sp} zeigt. Die Reaktion ist also offenbar an einem Punkte angekommen, wo dem Enzym keine rasch spaltbaren Bindungen mehr zur Verfügung stehen.

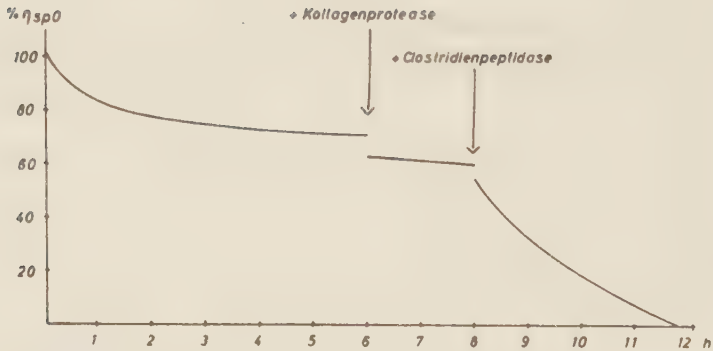
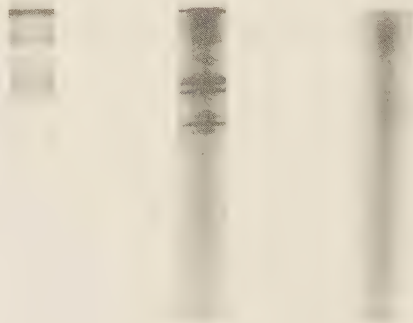


Abb. 4: Viskosimetrische Verfolgung des Kollagenabbaus durch das kollagenolytische Enzym aus *Achromobacter*.
Fortführung der Reaktion durch *Clostridienpeptidase* A.



Diskelektrophorese der Reaktionsgemische. Von links nach rechts: Kontrollansatz ohne Enzym. Abbau durch das kollagenolytische Enzym. Abbau mit *Clostridienpeptidase* A.

Daß die apolaren Gruppen des Kollagenmoleküls im bisherigen Reaktionsverlauf wohl keinem stärkeren Angriff ausgesetzt waren, wird nach dem Zusatz von Clostridienpeptidase (Worthington Biochem. Corp. Freehold) klar. Dieses Enzym, das in spezifischer Weise die Sequenz Gly - Pro - x - Gly - Pro - x zu spalten vermag, senkt die Durchlaufzeit des Viskositätsgemisches nach wenigen Stunden auf die des Lösungsmittels herab. Das Enzym-Substratverhältnis wurde hierbei mit 1:100 bewußt nieder gehalten.

b) Diskelektrophorese

Bei der diskelektrophoretischen Untersuchung (Versuch 4, exp. Teil) einer Probe, die dem Viskositätsgemisch kurz vor Zugabe der Clostridienpeptidase entnommen wurde, fällt auf, daß die α -Ketten wolkig verbreitert sind. Vor ihnen läuft eine starke Bande, die symmetrisch von zwei schwächeren Komponenten eingesäumt ist. Zwischen α - und β tritt eine zarte Doppelbande auf. Einige schwach angefärbte Abbauprodukte eilen dem ganzen Komplex voraus.

Nach dem Abbau mit Clostridienpeptidase lassen sich in der Diskelektrophorese weder intakte Ketten des Kollagenmoleküls noch kleinere Bruchstücke nachweisen. Offenbar wurde das Substrat vollständig in kleine Peptide abgebaut.

Zusammenfassend kann man sagen, daß der Abbau von Kollagen mittels des kollagenolytischen Enzyms aus *Achromobacter* einen relativ langsamen Prozess darstellt. Die Spaltprodukte sind verhältnismäßig hochmolekular, was in einem Abfall der spezifischen Viskosität von nur 30% zum Ausdruck kommt und auch aus der diskelektrophoretischen Auftrennung hervorgeht. Möglicherweise erfolgt der Angriff am Kollagenmolekül vom Ende her, wie es von unspezifischen Enzymen bekannt ist. Die Vielzahl der Banden würde auf eine ziemlich breite Spezifität des Enzyms hindeuten.

IV. Die Peptidase

1. Züchtung

Als Kulturmedium für die Untersuchungen an der Peptidase diente Medium 1 (Thioglycolat). Die Züchtung lief nach den gleichen Grundsätzen ab, wie sie unter Kapitel II schon beschrieben wurden.

2. Untersuchungen zur Frage Exo- oder Endoenzym

a) Ermittlung der Wachstumskurve

Wie bereits in den Vorbemerkungen zu Kapitel I erwähnt, läßt sich durch Zuordnung der Enzymaktivität des Mediums zur Wachstumskurve die Frage Exo- oder Endoenzym beantworten.

Die Beobachtung des Trübungsgrades der Kultur mit freiem Auge stellt nur eine grobe Beurteilung des Wachstums dar. Exaktere Ergebnisse bringt die Messung des Streulichtes, das bei Lichtdurchgang von den Keimen ausgesandt wird oder eine direkte Auszählung im Mikroskop.

In dieser Arbeit wurde folgendermaßen vorgegangen:

Täglich wurden den Kulturen konstante Volumina entnommen, zentrifugiert (20 Minuten bei 1000xg), der aus den Bakterien bestehende Niederschlag durch Nachwaschen mit physiologischer Kochsalzlösung von Mediumsresten gereinigt und anschließend der Stickstoffgehalt nach einer Stickstoffmikrobestimmung nach Strauch (Strauch, L., 1965) bestimmt.

Bei letzterer handelt es sich um eine Modifikation der klassischen Kjeldahlmethode. Der rasche Ablauf der Bestimmung ist vor allem auf die Verwendung eines beheizbaren Thermoblockes zurückzuführen, in dem der Aufschluß wesentlich verkürzt wird. Nach Verdünnung mit Wasser werden die Proben mit Nesslerreagenz versetzt und colorimetrisch ausgewertet (Versuch 14, exp. Teil).

Der Stickstoffgehalt des Niederschlages kann als direktes Maß für die Keimzahl benützt werden.

In Abb. 5 kann man erkennen, daß nach einer verhältnismäßig ausgedehnten Latenzphase am 2. Tag ein steiler Anstieg der Keimzahl (—) eintritt. Am 3. oder 4. Tag gelangt die Kultur in die Ruhephase, die mindestens bis zum 7. Tag andauert.

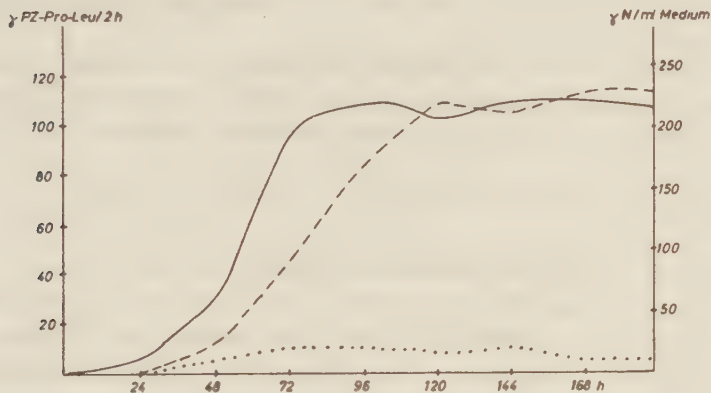


Abb. 5: Abhängigkeit der Peptidaseaktivität vom Keimwachstum.

— N-gehalt des Niederschlages
----- Peptidaseaktivität im Medium
..... Peptidaseaktivität des Zellaufschlusses

b) Bestimmung der Enzymaktivität

In gleicher Weise, wie für die Stickstoffbestimmung, wurden auch zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität täglich aliquote Mengen des Nährmediums entnommen und zentrifugiert. Der Überstand, der frei von Keimen war, wurde für die PZ-Penta-Analyse verwendet. Der Niederschlag wurde im Ausgangsvolumen in Tris-Puffer resuspendiert, zweimal eingefroren und wieder aufgetaut, 30 mal 1 Minute beschallt (Versuch 2, exp. Teil) und ebenfalls auf Peptidaseaktivität mit dem Hexapeptid geprüft.

Die Abbildung 5 gibt den Verlauf wieder. Die PZ-Aktivität (----) im Medium steigt im Vergleich mit der Wachstumskurve nicht ganz so steil an und schlägt etwas verspätet, aber weit innerhalb der Ruhephase, auf ein konstantes Niveau ein.

Die durch Frieren und Tauen und anschließende Beschallung zerstörten Bakterien wiesen demgegenüber eine verschwindend kleine Aktivität auf (....).

Auf Grund dieser Befunde darf man nun sicher annehmen, daß diese Achromobacterpeptidase von den lebenden Keimen aktiv ins Medium abgegeben wird und damit ein Exoenzym darstellt.

3. Weitere Reinigung

a) Bestimmung der spezifischen Aktivität

Um den Ablauf der Reinigung sinnvoll zu planen, ist es notwendig, sich über die Effektivität der einzelnen Schritte eine Übersicht zu verschaffen. Bezieht man die Aktivität der gewonnenen Fraktionen jeweils auf den Proteingehalt, so erhält man einen ausgezeichneten Maßstab für den Grad der Anreicherung. Der Quotient Enzymaktivität : Proteingehalt wird als spezifische Aktivität bezeichnet und trägt die Benennung Aktivitätseinheit pro mg.

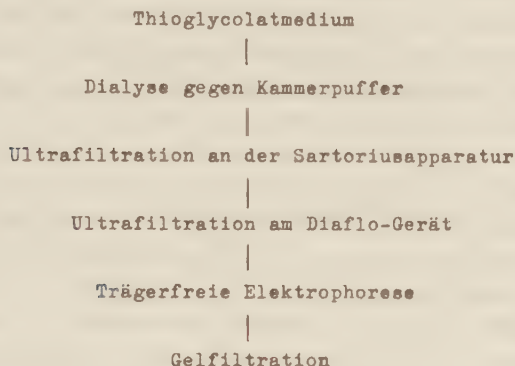
α) Die Austestung der Peptidaseaktivität erfolgte wie bisher mit dem Modellpeptid PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg (Wünsch, E., Heidrich, H.G., 1963). Die Aktivitätseinheit wurde ausgedrückt in γ Pz - Pro - Leu/Stunde.

β) Zur Ermittlung des Proteingehaltes wurde hier auf eine Modifikation der Methode nach Folin - Ciocalteu (Folin, O. und Ciocalteu, V., 1927), (Schaub, M., 1967) zurückgegriffen. Sie ist etwa 100 mal empfindlicher als die Biuretestimmung. Ein blauer Farbstoff, der von der Reduktion einer Phosphormolybdat - Phosphorwolframat - Reagenslösung (Folin - Ciocalteu - Reagens) durch Tyrosin und Tryptophan der Proteinklösung herrührt, wird hierbei colorimetrisch ausgewertet. Da die Farbreaktion nur bis etwa 600 γ Protein/ml der Proteinkonzentration direkt proportional ist, müssen die Proben von Fall zu Fall verdünnt werden, um im erforderlichen Konzentrationsbereich zu liegen (Versuch 12, exp. Teil).

Die Thioglycolatmedien mußten vor dieser Bestimmung einer ausgiebigen Dialyse unterzogen werden, um das Thioglycolat, welches sich störend auf die Reaktion auswirkt, restlos zu entfernen.

b) Reinigungsversuche

Zunächst soll ein Schema einen kurzen Überblick über die einzelnen Aufarbeitungsschritte geben:



Wie man sieht, gleicht die Aufarbeitung im wesentlichen derjenigen von Kapitel II. Neu hinzugekommen sind eine einleitende Dialyse sowie eine Gelfiltration als Abschluß.

α) Dialyse

Nachdem die Medien, wie in Kapitel II,1, durch Zentrifugation und Filtration von den Bakterien befreit waren, wurden sie einer ausgiebigen Dialyse gegen mehrfach gewechselten Kammerpuffer, wie er später in der Elektrophorese zur Anwendung kam, ausgesetzt. Dadurch sollte vor allem Thioglycolat restlos entfernt werden, das in die Proteinbestimmung mit eingeht. Wie an der Färbung des Dialysenwassers beobachtet werden konnte, diffundierte dabei auch bereits ein Teil der bräunlichen Nährpeptone durch den Dialysenschlauch in die Umgebung, so daß diese Prozedur wohl schon eine kleine Anreicherung darstellte. Verluste in der enzymatischen Aktivität traten innerhalb von 12 Stunden nicht ein.

β) Ultrafiltration am Diaflo-Gerät (Versuch 8, exp. Teil)

Eine weitere exakte Einengung erfolgte am Diaflo-Gerät der Amicon-

Corporation. Durch die Rotation eines Magnetührers, der dicht über der Membran angebracht ist, wird eine Anhäufung von Protein am Boden der Druckkammer verhindert und damit eine konstante Durchflußrate gesichert. Aktivitätsverluste liegen hierbei vergleichsweise nieder, die Anreicherung nahm um das 2 - 3fache zu. Die Ultrafiltrationen wurden sämtlich in der Kälte durchgeführt.

8) Trägerfreie Elektrophorese

Auf Grund ihrer hohen Kapazität wurde die trägerfreie Elektrophorese zur Vorreinigung beibehalten (Versuch 9, exp. Teil), nachdem Trennversuche mittels Säulenchromatographie keine größere Anreicherung einbrachten (Versuch 16, exp. Teil).

Abb. 6 zeigt eine solche Auftrennung an Bio - Gel A 1,5 (Bio-Rad). Dieses Material setzt sich aus kugelförmigen Agaroseteilchen zusammen, deren mittlere Größe sehr konstant ist. Daraus resultiert das ausgezeichnete Auflösungsvermögen. Die Zahl 1,5 gibt das Ausschlußmolekulargewicht in Millionen an.

Es stellte sich heraus, daß mit dieser Methode eine Abtrennung des Pigmentanteiles von den Enzymfraktionen nicht so vollständig wie in der Elektrophorese gelingt.

Die elektrophoretischen Trennungen ergaben im Mittel eine 4fache Anreicherung. Leider mußten dabei Aktivitätsverluste bis zu 30% in Kauf genommen werden. Nachdem das Enzym in den Fraktionen unmittelbar unter der Einspritzstelle (entsprechend Fraktion 70) gefunden wurde (Abb. 2) und damit offenbar im elektrischen Felde nicht abgelenkt worden war, lag die Vermutung nahe, daß dieser isoelektrische Zustand sich nachteilig auf die Stabilität auswirkte. Deshalb wurden Auftrennungen vorgenommen, bei denen der pH des Kammerpuffers von ursprünglich pH 8,0 auf pH 8,5 abgeändert war. Es verschob sich dabei das Maximum der Enzymkurve um 3 - 4 Fraktionen gegen die Anode, höhere Aktivitätsausbeuten konnten jedoch nicht erzielt werden.

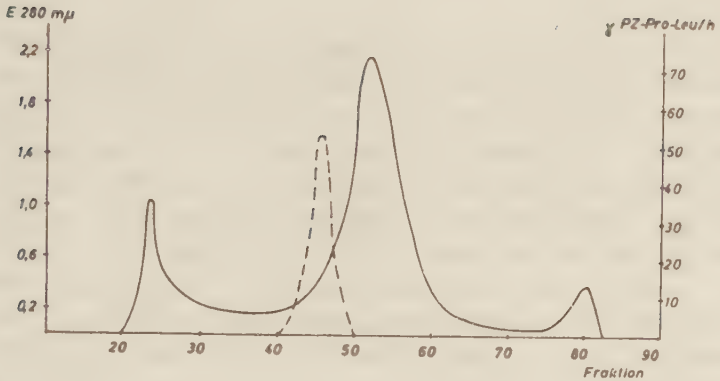


Abb. 6: Auftrennung von Thioglycolatmedium an Bio-Gel A 1,5

————— E₂₈₀ mμ
----- Peptidaseaktivität

δ) Vorversuche für eine weitere Reinigung

Um den nächsten Schritt hinsichtlich einer weiteren Anreicherung möglichst effektiv zu gestalten, war es naheliegend, die bisherige Trennung nach der Ladung der Moleküle durch eine Methode zu ergänzen, in der die Molekülgröße erfaßt werden konnte. Da sich neben der Gelchromatographie hierfür auch die präparative Disk-elektrophorese anbietet, wurde zunächst eine Probe der Peptidasefraktion in der analytischen Disk-elektrophorese (Versuch 4, exp. Teil) aufgetrennt und die Lage der Enzymbande innerhalb des Geles bestimmt.

Dies war insofern notwendig, als in der präparativen Disk-elektrophorese nur relativ rasch wandernde Proteine mit Erfolg getrennt werden können. Das System entspricht dem der analytischen Disk-elektrophorese, wobei jedoch ein quer zur Laufrichtung fließender Pufferstrom die aus dem Gel austretenden Eiweißfraktionen aufnimmt. Selbst wenn die Fließgeschwindigkeit des Puffers stark vermindert wird, wie es im Gerät nach Strauch (Strauch, L., 1970) geschieht, werden langsam wandernde und also auch langsam in den vorbeiströmenden Puffer eintretende Substanzen außerordentlich

stark verdünnt.

Um einen Anhalt für die Laufgeschwindigkeit der Peptidase zu gewinnen, wurden 10 Gele einer Peptidaseauftrennung im System Schaub - Strauch (Schaub, M. und Strauch, L., 1967) in je 20 Segmente von 0,5 cm Länge unterteilt, die entsprechenden Segmente vereinigt, gepottert und mit Puffer eluiert. In den einzelnen Eluatn wurde sodann die Peptidaseaktivität bestimmt. Zwei Gele des gleichen Laufes wurden mit Amidoschwarz gefärbt.

In Abb. 7 ist die Enzymaktivität der diskelektrophoretischen Auftrennung zugeordnet. Da die photographische Wiedergabe der einzelnen Banden sehr unbefriedigend war, wurde eine Skizze des Geles angefertigt. Wie zu erkennen ist, bewegt sich die Enzymfraktion nach einer Laufzeit von 5 Stunden noch im oberen Drittel. Damit schied die präparative Diskelektrophorese als weiterer Reinigungsschritt aus.

Der beschriebene Versuch bietet den positiven Befund, daß das System Schaub - Strauch eine Wanderung und damit eine Darstellung der Peptidase erlaubt. Es kann also bei der diskelektrophoretischen Verfolgung der Reinigungsschritte verwendet werden.

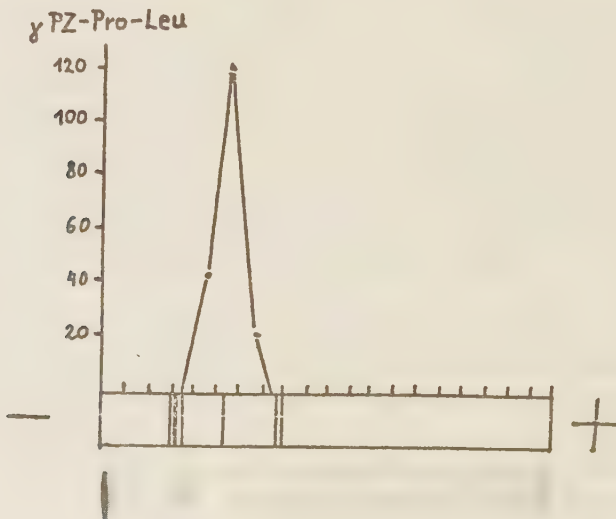


Abb. 7: Identifikation der Peptidasebande in der Disk-elektrophorese durch Segmentierung des Geles.

Tab. 2 Reinigung der Peptidase aus *Achromobacter*

Reinigungsschritt	ml	mg. Prot.	Ausb. Prot. %	Akt. Einh. vorh.	Ausb. Akt. %	Spez. Akt.	Anreicherung
Thiomedium nach Dialyse	600	6420	100	9000	100	1,4	1
Ultrafiltration (Sartorius)	72	864	13,4	5904	65,6	6,8	4,9
Ultrafiltration (Amicon)	9	315	4,9	4590	51	14,6	14,3
Trägerfreie Elpho (3Frakt.)	9	22,5	0,35	1638	18,2	72,8	52
Bio Gel A 0,5 (2 Frakt.)	14	0,42	0,007	700	7,7	1667	1190

ε) Gelfiltration

Somit wurde also eine weitere Auftrennung des Peptidase - Maximums aus der trägerfreien Elektrophorese, wie es etwa Fraktion 69 - 73 des Thioglycolatmediums in Abb. 1 entspricht, durch Gelfiltration vorgenommen. Verwendung fand Bio-Gel A 0,5 (Bio-Rad), das eine Fraktionierung in einem Molekulargewichtsbereich von 30 000 - 500 000 gestattet (Versuch 16, exp. Teil). Damit konnte eine weitere Anreicherung um mehr als das 20fache erreicht werden (Abb. 8).

Tabelle 2 gibt noch einmal einen Überblick über die Reinigungsschritte unter Anführung der einzelnen Anreicherungs-faktoren und Ausbeuten.

{) Verfolgung der Reinigungsschritte

Nach den einzelnen Reinigungsschritten wurden die Proben diskoelektrophoretisch im System Schaub - Strauch (Schaub, M. und Strauch, L., 1968) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau R 250 angefärbt. (Versuch 4, exp. Teil). Aus der Zahl der Banden konnte damit bei den einzelnen Präparationen der Grad der Einheitlichkeit gut beurteilt werden.

Da die photographische Wiedergabe der Trennungen unzulänglich ist, wurde in Abb. 9 den Aufnahmen jeweils eine Skizze beige-fügt, die die Einzelheiten, wie sie mit freiem Auge gesehen werden konnten, besser darstellt.

Man erkennt, daß nach der elektrophoretischen Vorreinigung aus dem komplexen Bild des Ausgangsmaterials (Abb. 9) die Banden innerhalb der unteren Gelhälfte verschwunden sind.

Nach der Gelfiltration kommt nur noch eine Bande im oberen Teil zur Darstellung. Mit freiem Auge war am originalen Gel eine zart angefärbte Zone knapp unter dem oberen Gelende zu finden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in einem Arbeitsgang, der nur zwei Trennschritte im eigentlichen Sinne umfaßt, eine Präparation von erstaunlich hohem Reinheitsgrad hergestellt werden konnte. Sie war hinreichend geeignet für eine nähere Charakterisierung der Peptidase.

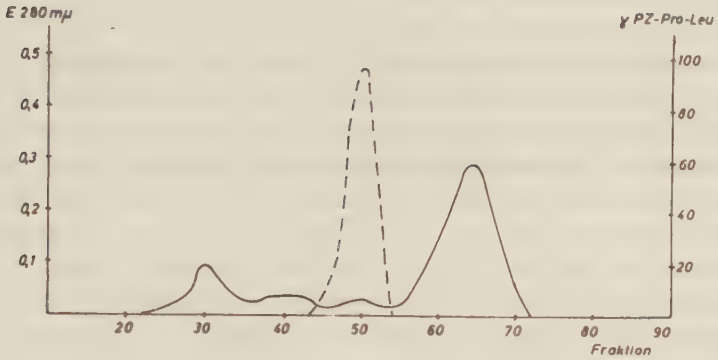


Abb. 8.: Auftrennung der Peptidasefraktion aus der trägerfreien Elektrophorese an Bio-Gel A 0,5.

————— $E_{280m\mu}$
 - - - - - Peptidaseaktivität

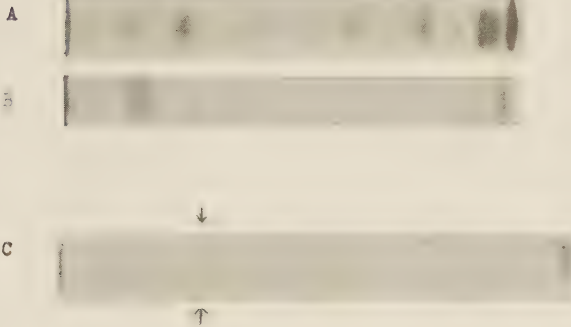


Abb. 9.: Diskelektrophoretische Verfolgung der Reinigungsschritte

A: Ausgangsmaterial
 B: Peptidasepeak aus der trägerfreien Elektrophorese
 C: nach Gelchromatographie an Bio-Gel A 0,5
 Die Diskelektrophorese in C stellt einen getrennten Lauf dar.
 Anfärbung: Coomassie Brilliant Blau

4. Charakterisierung der Peptidase

a) Lokalisation der Spaltstelle innerhalb des Pentapeptids

Um den Ort der Spaltung innerhalb des Pentapeptids herauszufinden, wurden mehrere Versuchsansätze vereinigt, mit Benzol ausgeschüttelt und die damit extrahierten fettlöslichen Bruchstücke dünn-schicht-chromatographisch mit dem Bruchstück PZ - Pro - Leu sowie dem kompletten Substrat PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg verglichen (Versuch 16, exp. Teil). Dabei stellte sich heraus, daß das Molekül genau zwischen Leu und Gly gespalten worden war (Abb. 107). Diese Position entspricht genau dem Angriffspunkt der Clostridien-kollagenase.

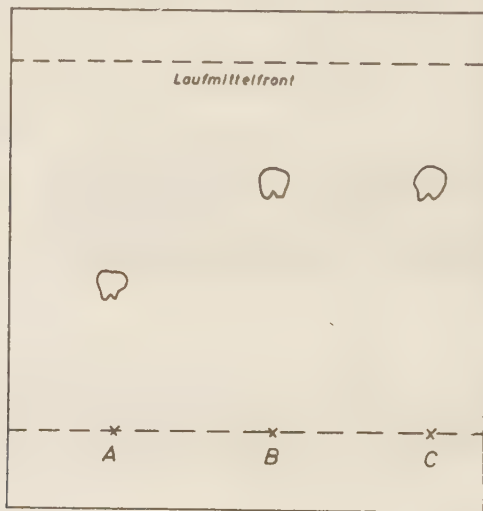


Abb. 10: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pentapeptidspaltstücke

A: PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg

B: PZ - Pro - Leu (Testsubstanz)

C: Peptidaseansatz

b) Molekulargewichtsbestimmung

Die Gelfiltration ermöglicht die Trennung von Substanzen auf Grund deren unterschiedlicher Molekülgröße. Diese Tatsache läßt sich zur Bestimmung des Molekulargewichtes heranziehen. Für Moleküle, die in die Polysacharidstruktur der Gelpartikel eindringen können, besteht dabei eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes und ihrem Elutionsvolumen V_E (Granath, K.A. und Flodin, P. 1961).

Die einfache Durchführung dieser Methode, wie sie vor allem von Fritz für Sephadex beschrieben wurde (Fritz, H., Trautschold, J., Werle, E., 1965) sprach für eine Anwendung bei der vorliegenden Arbeit.

Die Bestimmung wurde an der Bio-Gel A 0,5 - Säule vorgenommen, an der der letzte Schritt der Peptidasereinigung erfolgt war. Das Leervolumen wurde mit Dextranblau bestimmt. Als Vergleichssubstanzen dienten Catalase (MG = 230 000) und Rinderalbumin (MG = 67 000) (Versuch 17).

Die graphische Auswertung (Abb. 11) ergab für die Peptidase ein Molekulargewicht um 140 000.

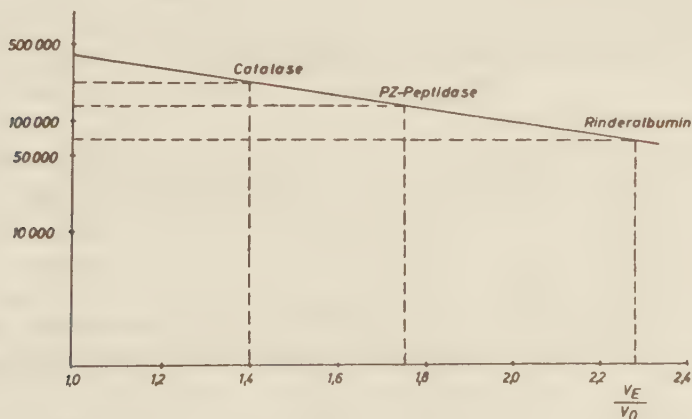


Abb. 11.: Molekulargewichtsbestimmung an Bio Gel A 0,5

c) pH - Optimum

Das pH - Optimum der Peptidase wurde im System Tris-Acetat-HCl bestimmt. Der untersuchte Bereich erstreckte sich von pH 5,0 bis pH 9,5 (Versuch 18, exp. Teil). Im Gegensatz zur Clostridienpeptidase, deren Optimum als breites Plateau im Neutralen liegt, erreicht die hier bearbeitete Peptidase ihre maximale Aktivität erst im alkalischen Milieu (Abb. 12).

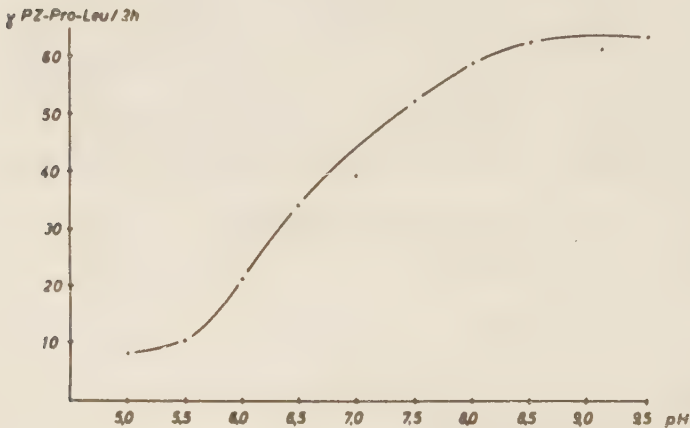


Abb. 12: Bestimmung des pH-Optimums der Peptidase

d) Michaeliskonstante

Um ein Maß für die Affinität der Peptidase zum synthetischen Penta-peptid zu erhalten, wurde die Michaeliskonstante bestimmt (Versuch 19, exp. Teil).

Bekanntlich steigt die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion mit zunehmender Substratkonzentration an und strebt schließlich einem Maximalwert zu, der auch bei weiterer Substratzugabe nicht überschritten wird. Diejenige Substratkonzentration, die genau die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit zuläßt, wird als Michaeliskonstante K_m bezeichnet und in Mol/Liter ausgedrückt.

Das Verhalten der Enzyme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration findet ihren mathematischen Ausdruck in der Gleichung von Michaelis - Menten:

$$v = \frac{V S}{K_m + S}$$

Hierbei bedeuten v = Reaktionsgeschwindigkeit

V = Maximalgeschwindigkeit

S = Substratkonzentration

K_m = Michaeliskonstante

Durch Umwandlung gelangt man zu

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$$

Es ist dies die Gleichung einer Geraden, wie man sie erhält, wenn man in der doppelt - reziproken Auftragung nach Lineweaver - Burk K_m und V ermittelt. Dabei werden an der Abszisse die Kehrwerte der Substratkonzentrationen, an der Ordinate die der Geschwindigkeit aufgetragen. Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse entspricht $-\frac{1}{K_m}$ (s. Übersicht: Dixon, M. und Webb, E.C., 1964)

In Abb. 13 wurde auf diese Weise K_m graphisch ermittelt. Zu berücksichtigen ist, daß die Substratkonzentrationen in μM pro Ansatz (3,0 ml) angegeben sind, die Michaeliskonstante jedoch üblicherweise in der Dimension Mol pro Liter ausgedrückt wird. Nach einer dementsprechenden Umrechnung ergibt sich für die Peptidase ein K_m -Wert von etwa $8,3 \times 10^{-5}$ Mol/Liter. Das bedeutet, daß es sich hier um eine hohe Substrataffinität handelt, nachdem sich die K_m -Werte der meisten Enzyme zwischen 10^{-2} bis 10^{-5} Mol/Liter bewegen.

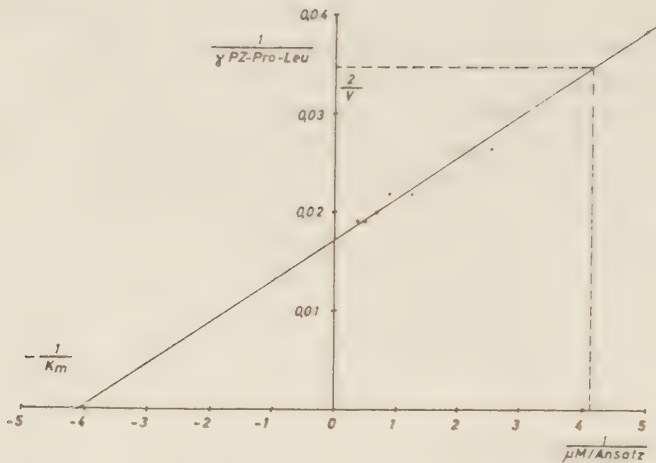


Abb. 13: Ermittlung der Michaeliskonstanten der Peptidase
am PZ-Substrat (Auftragung nach Lineweaver-Burk)

5. Kollagenabbauversuch

Nachdem sich in den vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt hatte, daß die Peptidase das Kollagenmodellpeptid in ganz ähnlicher Weise zu spalten vermag wie die Clostridienkollagenase, und außerdem die außerordentlich enge Beziehung zu diesem Substrat in der Michaeliskonstanten zum Ausdruck gekommen war, sollte noch einmal das Verhalten des Enzyms gegenüber dem hochmolekularen Substrat, dem Kollagen, geprüft werden.

Die gereinigte Peptidase-Präparation erlaubte es nun, in den folgenden Versuchen ein angemessenes Enzym - Substrat - Verhältnis einzuhalten (1:10). Es wurde in üblicher Weise der fragliche Kollagenabbau im Viskosimeter verfolgt und das Gemisch anschließend diskoelektrophoretisch aufgetrennt. Parallel dazu wurde das kollagenolytische Enzym, wie es nach der Vorrreinigung in der tragerfreien Elektrophorese

zur Verfügung stand, ausgetestet.

Nach 4h war die spezifische Viskosität durch Peptidaseeinwirkung bei 20°C und pH 7,5 nur um etwa 8% gesunken. Demgegenüber konnte im Falle des kollagenolytischen Enzyms ein Abfall von rund 25% in der entsprechenden Zeit verzeichnet werden.

Eine Gegenüberstellung der Diskelektrophorese dieser Inkubationsgemische gibt Abb. 14 wieder. Die Auftrennung der viskosimetrisch positiven Analyse zeigt das bekannte Bild des kollagenolytischen Abbaus, wie er im Kapitel III beschrieben wurde.

Im Falle der hochaktiven Peptidasepräparation sind dagegen nicht die geringsten Anzeichen für eine Kollagenspaltung zu finden.



Abb. 14: Diskelektrophoretischer Vergleich der Kollagenlösungen nach Einwirkung des kollagenolytischen Enzyms aus *Achromobacter* (B), sowie der gereinigten Peptidase (C). A ist Kontrolle ohne Enzym.

D i s k u s s i o n

Kollagenolytische Enzyme stellen, wie ein Studium der gegenwärtigen Literatur beweist, eine biologische Rarität dar. Die wichtigsten Vertreter wurden bisher im Bereich der Bakterien an Clostridien entdeckt. Ihr Nachweis erhellte pathogenetische Zusammenhänge und wirkte sich befruchtend auf die Kollagenforschung aus. Unter solchen Aspekten erschien eine nähere Untersuchung des hier beschriebenen Stammes der Gattung *Achromobacter* reizvoll, nachdem das hartnäckige Auftreten dieses Keimes in Kollagenaufarbeitungen als Hinweis auf besondere kollagenolytische Eigenschaften gewertet worden war.

In Anlehnung an die wohlbekannte Clostridienpeptidase A wurde zur Prüfung eventueller Kollagenaseaktivität neben nativem Kollagen auch das synthetische Modellpeptid PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg verwendet, das eine Sequenz der apolaren Bereiche des Kollagenmoleküls verkörpert. Die Verwendung des synthetischen Substrates zum Nachweis echter Kollagenasen sollte im Experiment einer kritischen Untersuchung unterzogen werden.

Beziehungen zwischen Nährmedium und Enzymproduktion des *Achromobacter* Eingangs stellte sich die Frage, welche Nährmedien den *Achromobacter* Keimen die günstigsten Bedingungen für eine Entfaltung der gesuchten enzymatischen Aktivitäten bieten konnten.

Ein Vergleich der Ergebnisse, die mit den Nährmedien der Tabelle 1 erzielt wurden, läßt bereits richtungsweisende Schlüsse auf die Enzymtätigkeiten des Stammes zu.

Es werden beide Substrate, Kollagen und Modellpeptid gespalten.

Aus der Beobachtung, daß das synthetische Substrat in allen Kulturen mit positivem Wachstum in einem Grad angegriffen wird, der dem Ausmaß des Wachstums proportional zu sein scheint, das natürliche dagegen nur in zwei Medien mit geringer Keimzahl, folgt, daß die Spaltungen der beiden Substrate auf die Aktion mindestens zweier Enzyme zurückgehen.

Der Ausfall der kollagenolytischen Aktivität in Medium 1 - 5

Könnte durch die Gegenwart von Inhibitoren beziehungsweise Aktivatoren in diesen Nährlösungen bedingt sein. Bekannt ist die Hemmbarkeit der Clostridienpeptidase A durch SH-Verbindungen (Seifter, S., et al., 1959). Diesbezügliche Verbindungen finden sich in Form von Cystein und Thioglycolat in Medium 1. Das bis auf diese beiden Substanzen analog aufgebaute Medium 2 läßt jedoch kollagenolytische Aktivität ebenso vermissen wie Medium 1. Bei weiteren Vergleichen (Versuch 1, exp. Teil) kann kein Bestandteil entdeckt werden, der in allen inaktiven Nährlösungen enthalten ist und somit als Inhibitor zu werten wäre. Überlegungen in umgekehrter Richtung lassen eine Enzymaktivierung in Medium 6 und 7 ebenfalls ausscheiden, wenn man die Kollagenzusätze als Aktivatoren in eigentlichem Sinne ausschließt.

Die unterschiedliche Verteilung der kollagenolytischen Aktivität ließe sich noch folgendermaßen erklären: Entweder erfolgt in den Medien 6 und 7 eine Art Mutantenselektion oder die zugegebenen Kollagen- bzw. Gelatineanteile regen in allen Keimen entsprechende Enzymproduktion an, was einem Induktionsmechanismus gleich käme.

Die vorliegenden Ergebnisse machen die erste Annahme zumindest unwahrscheinlich. Im Kollagenmedium (Medium 7) ist die Casein-Yeastolat-Konzentration reduziert und dafür Kollagen als ausgleichende Stickstoffquelle eingeführt. Sollte der vorliegende Stamm eine Mutante mit besonderen kollagenolytischen Eigenschaften enthalten, so würde mit einer solchen Nährbodenkombination das Wachstum dieser Mutante selektiv gegenüber den Keimen gefördert, die nicht in der Lage sind, ihren Stickstoffbedarf aus Kollagen zu decken. Nachdem die Organismen unmittelbar aus Kollagenverarbeitungen überzüchtet sind, dürfte ein hoher Prozentsatz in der hypothetischen Mutantenform vorliegen. Um letztere zugunsten der nicht Kollagenase bildenden Keime zurückzudrängen, reicht jedoch eine einmalige Überimpfung auf ein Nährmedium ohne das erforderliche Substrat (Kollagen), wie sie in Medium 1 - 5 erfolgte, nicht aus. Erst eine Vielzahl solcher Passagen vermag die Mutantenform restlos zu unterdrücken.

Unter diesen Umständen ist der Gedanke an eine Induktion des kollagenolytischen Enzyms am zutreffendsten. Zusätzliche Experi-

mente, etwa spezielle Züchtungsverfahren, könnten näheren Aufschluß in dieser Frage bringen. Interessant ist in dem Zusammenhang, daß Induktionsversuche mit Gelatine und Kollagen an Clostridien keinen Erfolg hatten (Mac Lennan, J.D., et al., 1953).

Die Enzymmuster von Bakterien können sich je nach dem Sauerstoffangebot, unter dem die Aufzucht erfolgt, verändern. Alle bekannten Kollagenasen bakteriellen Ursprungs stammen entweder von strikten Anaerobiern (Clostridien, Bacteroides) oder werden nur unter anaeroben Bedingungen produziert (Staphylococcus aureus, s. Waldvogel, F.A., Swartz, M.N., 1969). Aus dem günstigen Wachstum in den Anaerobiermedien 1 und 5 geht hervor, daß der vorliegende Stamm der Klasse der fakultativen Anaerobier zuzurechnen ist. Erwartungen bezüglich der Entwicklung besonderer enzymatischer Aktivität im anaeroben Milieu wurden jedoch nicht erfüllt.

Die Lokalisation der bisher in der Literatur erschienenen bakteriellen Kollagenasen ist unterschiedlich. In Bacteroides melaninogenicus liegt das Enzym stets intrazellulär vor (Hausmann, E., Kaufmann, E., 1969), wohingegen es die Clostridien aktiv in den Extrazellulärraum abscheiden. Die hier an Achromobacter untersuchten Enzyme konnten in Zellaufschlüssen (Frieren, Tauen, Beschallen) nicht nachgewiesen werden und sind demgemäß als extrazellulär zu bezeichnen. Vom biologischen Standpunkt versteht sich dieser Befund von selbst, da eine Aufnahme von Substanzen mit den Ausmaßen eines Kollagenmoleküls ins Innere der Zelle kaum vorstellbar ist.

Das kollagenolytische Enzym

Die Auftrennungen von Medium 1,6 und 7 durch trägerfreie Elektrophorese (Abb. 2) liefern endgültig den Beweis, daß die Spaltung des natürlichen Kollagens und des Modellpeptids der Tätigkeit zweier verschiedener Enzyme zuzuschreiben ist, nämlich einem kollagenolytischen Enzym und einer Peptidase.

Aus den Elektrophoresediagrammen sowie den Versuchen, die mit grob vorgereinigtem Material unternommen wurden, lassen sich über

Arbeitsweise und Spezifität des kollagenolytischen Enzyms nur begrenzte Aussagen machen.

Kollagenolytische Enzyme vermögen neben Kollagen auch andere Eiweiße abzubauen. Definitionsgemäß wird hingegen von einer echten Kollagenase verlangt, daß für sie kein anderes Protein außer Kollagen angreifbar ist (Nordwig, A. u. Jahn, F., 1968). Diese Bedingung erfüllt im mikrobiologischen Bereich bisher lediglich die Clostridienpeptidase A (Nordwig, A., 1962). Das entsprechende Enzym aus *Bacteroides melaninogenicus* (Hausmann, E., Kaufmann, E., 1969) ist noch mit einer geringen unspezifischen Proteaseaktivität belastet, was unter Umständen mit dem mäßigen Reinheitsgrad der Präparation in Zusammenhang steht.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen nicht ausschließen, daß das gefundene kollagenolytische Enzym aus *Achromobacter* auch unspezifisch proteolytisch wirksam ist. Der Verlauf der Enzymaktivitäten in den Elektrophoresediagrammen (Abb. 2) legt diesen Gedanken nahe, da mit dem Erscheinen der ^{14}C -Kollagenspaltung stets eine Verbreiterung des Caseinpeaks einhergeht, die das Maximum des Kollagenabbaus überschneidet.

Die viskosimetrischen, diskelektrophoretischen und radioaktiven Kontrollversuche mit Trypsin räumen dem Enzym jedoch gegenüber den herkömmlichen Proteasen hinsichtlich der Kollagenolyse eine eindeutige Sonderstellung ein.

Der viskosimetrisch verfolgte Abbau des Kollagens durch die beschriebenen Kulturfiltrate des *Achromobacter* findet bei etwa 70% der spezifischen Ausgangsviskosität sein Ende, allerdings läuft vermutlich die Reaktion mit sehr niedriger Geschwindigkeit noch weiter ab, so daß sie sich der Beobachtung über kürzere Zeiträume entzieht.

Ein Vergleich mit der Abbaugeschwindigkeit der Clostridienpeptidase A ist hier nicht angebracht, da die Einsatzhöhe des *Achromobacter*enzym unbekannt ist. Eindrucksvoll ist der Abfall der spezifischen Viskosität unter der Einwirkung von Clostridienkollagenase auf 0%, was der Durchlaufzeit des Lösungsmittels entspricht und mit der Beobachtung in Einklang steht, daß es sich bei den entstandenen Spaltprodukten um Peptide mit einer mittleren Sequenz von 7,5 Aminosäuren handelt (Nordwig, A., 1962).

Diskelektrophoretisch sind Peptide dieser Größenordnung nicht mehr nachzuweisen (Abb. 4).

Die Gross'schen Kollagenasen (Eisen, A.Z. et al., 1970) spalten gezielt ein $1/4$ -Bruchstück vom Kollagenmolekül ab und weisen damit die engste Substratspezifität auf. Sie vermögen dabei die spezifische Viskosität prozentual um etwa die Hälfte zu reduzieren.

Der Vergleich der Viskositätsverluste gestattet die Annahme, daß aus dem Abbau durch das Achromobacterenzym noch relativ hochmolekulare Spaltprodukte hervorgehen. Dies wird durch die geringe Mobilität der nach der Reaktion in der Diskelektrophorese neu auftretenden Banden noch unterstrichen. Ihre Vielzahl läßt eine sehr breite Substratspezifität vermuten.

Der enzymatische Angriff erfolgt möglicherweise von den gestreckten Telozeptiden des Kollagenmoleküles her, die auch einem unspezifischen proteolytischen Abbau am ehesten zugänglich sind. Damit wäre der Weg zu den helikalen Strukturen eröffnet, die nach Entwindung schrittweise verkürzt werden. Ein solcher Mechanismus wurde für die Wirkung der Pronase, einem Enzymgemisch aus *Streptomyces griseus* mit Proteaseeigenschaften am Kollagen postuliert (Drake, M.P. et al., 1966). Bestimmte Bindungen im Molekül würden dann dem Abbau einen stärkeren Widerstand entgegensetzen und zu einer Anhäufung von Molekülresten entsprechender Länge führen, die sich diskelektrophoretisch als scharf abgegrenzte Banden ausweisen.

Die Peptidase

Der Achromobacterpeptidase wurde ein eingehenderes Studium zuteil, da das Enzym in der Spaltung des Hexapeptids eine enge Verwandtschaft mit der Clostridienpeptidase aufweist. Wie letztere wird sie von den Mikroorganismen aktiv ins Kulturmedium abgeschieden, stellt also ein Exoferment dar (Abb. 5).

Die Reinigung des Enzyms erlaubte eine nähere Charakterisierung. An der Isolierung selbst besticht die geringe Zahl der Arbeitsschritte, aus denen eine außerordentlich hohe Anreicherung resultiert (Tabelle 2). Die Prozedur gestattet einen reichlichen

Proteindurchsatz, was vor allem der überragenden Kapazität der trägerfreien Elektrophorese zuzuschreiben ist. Letztere erbringt zwar nur eine rund vierfache Anreicherung, ermöglicht aber eine klare Abtrennung der kollagenolytischen Aktivität von der Peptidasewirkung. Dieses Ziel konnte gelchromatographisch nicht erreicht werden, da sich die beiden Enzyme in ihren Größenausmaßen offenbar sehr ähnlich sind.

In der insgesamt 1200fachen Anreicherung spiegelt sich nicht allein die erfolgreiche Kombination zweier Methoden, die nach verschiedenen Kriterien trennen, nämlich nach elektrophoretischer Beweglichkeit (trägerfreie Elektrophorese) und Molekülgröße (Gelchromatographie). Von zusätzlicher Bedeutung ist, daß die Aufarbeitung aus einem Medium erfolgte, das neben Nahrungsstoffen in niedermolekularer Form nur einige wenige höhermolekulare Proteine enthielt, die von den Keimen ausgeschieden worden waren. Eine Isolierung aus Bakterienhomogenaten wird unter Umatänden erheblich mehr Schwierigkeiten bereiten, da hierbei eine Fülle von Eiweißkörpern anfällt, deren Molekulargewichte nur geringe Differenzen aufweisen und die damit schwer unterscheidbar sind.

Das Endprodukt ist noch nicht ganz einheitlich, in der Disk-Elektrophorese tritt neben der Enzymbande eine zweite, allerdings sehr zarte Bande auf, die die Gegenwart eines Begleitproteins in minimaler Konzentration anzeigt. Immunologische Untersuchungen sowie analytische Ultrazentrifugation hätten möglicherweise noch weitere Verunreinigungen aufgedeckt. Der gewonnene Reinheitsgrad ist jedoch hinsichtlich der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ausreichend.

Durch Auftrennung der Spaltprodukte in der Dünnschichtchromatographie wird die Identität des Angriffspunktes am Pentapeptid für die Peptidase aus Clostridien und Achromobacter demonstriert.

Differenzen treten beim Vergleich der Molekulargewichte dieser beiden Enzyme auf. Für die Clostridienkollagenase wurde aus dem Verhalten in der Ultrazentrifuge etwa 109 000 errechnet (Nordwig, A., 1962). Das für die Achromobacterpeptidase durch Gelchromatographie ermittelte Gewicht von 140 000 liegt, selbst wenn man eine methodische Fehlerbreite von 5 - 10% in Rechnung stellt,

eindeutig höher.

Wesentlich unterscheiden sich die pH-Optima. Während bei beiden Enzymen der Bereich optimaler Aktivität plateauartig verbreitert ist, entsprechen nur die für Clostridienpeptidase A gefundenen Werte der Forderung, eine echte Kollagenase müsse ihr Aktivitätsmaximum im Neutralen entwickeln. Bei letzterer fällt in Tris-Phosphat- und Boratpuffer das Optimum der Fermentwirkung zwischen 6,0 - 8,0 (Nordwig, A., 1962). Für die hier bearbeitete Peptidase wurden dagegen im Tris-Acetat-HCl-System maximale Spaltungen zwischen pH 8,5 und 9,5 gemessen.

Die Ermittlung der Michaeliskonstanten anhand des Pentapeptids als Substrat ergab für die Peptidase einen Wert um $8,3 \times 10^{-5}$ Mol/Liter. In der Literatur finden sich leider keine entsprechenden Hinweise über die Clostridienpeptidase A. Ein Vergleich mit dem K_m -Werten anderer Enzyme (10^{-2} - 10^{-5} Mol/Liter) zeigt, daß das Achromobacterenzym eine ausgesprochen hohe Affinität zum Modellpeptid besitzt. Auf Grund der fehlenden Aktivität gegenüber Casein (Abb.2) darf man annehmen, daß das Ferment sehr spezifisch nur in Sequenzen vom Aufbau dieses synthetischen Substrates eingreifen kann, wie sie im Casein nicht enthalten sind.

Ein wesentlicher Befund ist, daß selbst mit hohen Einsätzen der Achromobacterpeptidase kein Abbau am nativen Kollagen erzielt werden kann, obwohl sich das Modellpeptid als ausgezeichnetes Substrat erwiesen hatte. So mag eine Verwendung des synthetischen Substrates im speziellen Falle der Clostridienpeptidase A angebracht sein, eine Übertragung auf andere Enzyme ist jedoch, wie vorliegende Arbeit beweist, nicht angezeigt. Man muß sich eben darüber im Klaren sein, daß für die Funktion eines Enzymes nicht allein bestimmte Sequenzen im Substrat, sondern auch eine entsprechende räumliche Konfiguration Voraussetzung sind. Die Unangreifbarkeit des Kollagenmoleküls beruht in erster Linie auf der Triple-Helix-Struktur, wobei die Einzelketten zusätzlich noch durch ihren schraubenförmigen Aufbau vor einem unspezifischen fermentativen Angriff geschützt sind.

Die Bedeutung der hier an Achromobacter beschriebenen Peptidase liegt wohl in der Aufarbeitung von Kollagenpeptiden, wie sie

nach Spaltung durch Kollagenasen auftreten, oder im Abbau von Kollagen in denaturierter Form.

M e t h o d i k :

Versuch 1: Zusammensetzung der Nährmedien

Literatur: Müller, J., Melchinger, H., 1964

1. Thioglycolat-Medium:

dest. Wasser	1000,0 ml
Dextrose	5,5 g
Yeastolat	5,0 g
Caseinpepton	15,0 g
1-Cystinhydrochlorid	0,5 g
Na-Thioglycolat	0,5 g
NaCl	2,5 g

2. Caseinpepton-Yeastolat-Medium:

dest. Wasser	1000,0 ml
Dextrose	5,5 g
Yeastolat	5,0 g
Caseinpepton	15,0 g
NaCl	2,5 g

3. Yeastolat - Serum:

dest. Wasser	90,0 ml
Yeastolat	0,5 g
NaCl	0,25g
nach Autoklavierung	
Zugabe von sterilem Rinderserum (Behringwerke)	10,0 ml

4. Bactopepton-Medium:

dest. Wasser	100,0 ml
Dextrose	0,5 g
Bacto-Pepton	0,5 g
NaCl	0,25g

5. Tarozzi - Leberbouillon:

Meerschweinchenleber in haselnußgroße Stücke schneiden und in einem Kolben mit der 2-3-fachen Menge Fleischwasserbouillon (s.u.) pH 7,4

30 Minuten im Dampf kochen. Nach Abkühlen durch Faltenfilter bis zur völligen Klarheit filtrieren. Die im Filter verbleibenden Leberstückchen unter Wasserleitung kräftig abspülen, in Gläser verteilen, mit der 3-fachen Menge der filtrierten Bouillon übergießen und 20 Minuten bei 2 atü autoklavieren.

Herstellung der Fleischwasserbouillon:

Fleischwasser (s.u.)	1000,0 ml
Pepton	10,0 g
Glucose	5,0 g
NaCl	5,0 g
Gemisch bis zur Lösung aller Zusätze kochen.	

Herstellung von natursauem Fleischwasser:

1. Fleisch (Pferd, Rind) im Fleischwolf zerkleinern
2. Mit doppelter Gewichtsmenge Wasser über Nacht bei 4-6°C stehen lassen.
3. 1 - 3 Stunden auf 45-50°C erwärmen
4. 30 Minuten schwach kochen lassen
5. Zur Fettabscheidung abkühlen lassen
6. Durch doppeltes Faltenfilter filtrieren, Fleischreste vorsichtig abpressen, Filtrat auf ursprüngliches Volumen mit aqua dest. auffüllen.
7. Wenn nicht sofort weiter verarbeitet, 1 Stunde im Dampf sterilisieren.

6. Mäusehaut-Medium:

- a) Herstellung der PBS-Lösung (= Phosphate Buffered Salt Solution)

Lösung A:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x \text{H}_2\text{O}$	14,5 g
KH_2PO_4	2,0 g
aqua bidest.	ad 1000 ml

Lösung B:

$\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 1,96 g
aqua bidest. ad 100 ml

Lösung C:

$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g
aqua bidest. ad 100 ml

Arbeitslösung:

A 100,0 ml
B 10,0 ml
C 10,0 ml
aqua bidest. ad 1000 ml

In etwa 800 ml aqua bidest. gießt man zuerst Lösung A ein, dann C und zuletzt B. Mit aqua bidest auf 1000 ml auffüllen, pH etwa 7,3. Die Lösung wird unter sterilen Bedingungen durch EKS 1 Seitz-Filter (Seitz-Filter GmbH, Bad Kreuznach) filtriert.

b) 50 1-2 Tage alte Mäuse werden decapitiert und gehäutet. Die Haut wird in etwa 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke geschnitten, mehrmals in PBS-Lösung gewaschen und etwa im doppelten Gewichtsvolumen PBS-Lösung aufgenommen und autoklaviert.

7. Kollagenmedium/

dest. Wasser	1000,0 ml
Dextrose	5,5 g
Yeastolat	2,0 g
Caseinpepton	7,0 g
NaCl	10,0 g

Der erhöhte NaCl-Gehalt soll die Löslichkeit des im folgenden zugegebenen Kollagens verbessern.

Nach Autoklavierung wird die Lösung mit 100 ml einer steril filtrierten Kollagenlösung versetzt.

Sterilfiltration der Kollagenlösung:

100 ml einer 0,4%igen Lösung neutralsalzlöslichen Kollagens werden mit 0,1n HCl angesäuert und in 10 ml-Portionen durch eine 0,2 μ - Cellulose-Acetat-Membran (Typ SM 11307, Sartorius-Membranfilter GmbH) unter sterilen Bedingungen filtriert. Die Prozedur erfolgt in der Kälte.

Die filtrierte Lösung wird mittels Blutagarplatten auf Keimfreiheit geprüft.

Da der pH-Wert des Nährmediums nach Zusatz der Kollagenlösung ins Saure verschoben wurde, wird autoklavierte 0,1n NaOH steril bis zur Neutralisation zugegeben. An kleinen Proben wird der pH kontrolliert.

Alle Medien werden mit 0,1n NaOH auf pH 7,0 eingestellt und in 100 ml-Portionen in 250 ml Vierkantflaschen gefüllt, die mit Gummistopfen verschlossen sind. Die Autoklavierung erfolgt bei etwa 240°C entsprechend 2 atü über 20 Minuten.

Es werden jeweils 1 ml einer aktiv wachsenden Thioglycolat-Kultur mittels einer Einmalspritze überimpft. Die Inkubationstemperatur beträgt 37°C.

Versuch 2: Zellaufschluß

Literatur: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology
Immunity, 1961.

5,0 ml Medium werden 20 Minuten bei 1000 xg (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und für die Bestimmung exoenzymatischer Aktivität verwendet.

Der Niederschlag, der sich aus den Mikroorganismen zusammensetzt wird in 5,0 ml Tris-HCl pH 7,0 resuspendiert und bei - 20° eingefroren und wieder aufgetaut. Frieren und Tauen werden 2 x wiederholt. Die Proben werden in ein Eisbad gebracht und 30 x 1 Minute mit 20 Kc/s beschallt (60 Watt sonic oscillator, MSE). Der Beschallung schließt sich eine klärende Zentrifugation bei 12000 xg (Sorvall) an. Der Überstand wird der enzymatischen Bestimmung zugeführt.

Versuch 3: Viskosimetrie

Literatur: Hoppe - Seyler/ Thierfelder, Analyse, 10.Aufl.

Bd. II. Gross, J. und Nagai, Y, 1965

Kollagenlösung: Neutralsalzlösliches Kalbshautkollagen 0,4%ig.

Puffer: 0,2 m Tris (2,42 g/ 100 ml aqua dest.)

0,001 m Ca-Acetat x H₂O (17,6 mg/ 100 ml aqua dest.)

0,4 m NaCl (2,34 g/ 100 ml aqua dest.)

Ansatz: 1,0 ml Kollagenlösung + 2,0 ml Puffer in der Kälte zusammen-
geben. 2,0 ml dieses Gemisches + 1,0 ml Enzymlösung mischen.

Gemessen wird in einem Viskosimeter Typ Ubbelohde mit hängendem Niveau.
Temperatur 20°C, Wasserdurchlaufzeit 70 sec..

Berechnung der spezifischen Viskosität:

Nach der hydrodynamischen Theorie wird die Viskosität einer Lösung von der Störung bestimmt, die ein gelöstes Teilchen in der laminaren Strömung des Lösungsmittels verursacht. Im Falle des Fadenmoleküls Kollagen nimmt das Ausmaß dieser Störung und damit die Viskosität der Lösung ab, wenn das Molekül durch Spaltung verkürzt wird. Um hierfür eine charakteristische Größe zu gewinnen, dividiert man die Differenz aus der Viskosität der Lösung η und der des reinen Lösungsmittels η_L durch die Viskosität des reinen Lösungsmittels η_L . Dann ergibt sich die spezifische Viskosität

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_L}{\eta_L}$$

Mißt man bei so geringen Konzentrationen, daß die Dichteänderung der Lösung gegenüber dem Lösungsmittel vernachlässigbar klein ist, so kann vereinfachend für η die Durchlaufzeit t gesetzt werden und die Gleichung lautet:

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_L}{t_L}$$

t_L entsprach im vorliegenden Falle der Durchlaufzeit des Ansatzes, wobei an Stelle der Kollagenlösung aqua dest. eingesetzt wurde.

Versuch 4: Diskelektrophorese

Apperatur: Analytische Diskelektrophorese der Wissenschaftlich-
Technischen - Werkstätten Weilheim

1. Elektrophorese bei alkalischem pH

Literatur: Schaub, M. u. Strauch, L., 1968
Vorschrift der Fa. WTW Weilheim
Maurer, H.R., 1968

Elektrodenpuffer: 3 g Tris + 14,4 g Glycin mit 1 M NaOH gepuffert auf
pH 9,0, mit aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt.

Gelpuffer : 40,0 g Tris mit 1 M HCl auf pH 8,0 gebracht und mit
aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt.

Stocklösungen : (entsprechen einem 7,5%igem Gel, bezogen auf Acrylamid)
Haltbarkeit bei 4° etwa 1 Woche

I : 30,0 g Acrylamid und 0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid
(Bis), gelöst in 100,0 ml Gelpuffer

II : 1,6 ml Dimethylaminopropionitril gelöst in 100ml Gel-
puffer

III: 0,04 g Kaliumferricyanid gelöst in 100 ml Gelpuffer

IV : 0,48 g Ammoniumperoxydisulfat gelöst in 100 ml
Gelpuffer

Durchführung: Die Stocklösungen werden in der Reihenfolge I,II,III,IV
zu gleichen Teilen zusammengemischt, mit Hilfe der Was-
serstrahlpumpe in einem dickwandigen Gefäß etwa 20 Minu-
ten entlüftet, in die Gel-Röhrchen eingefüllt und mit
Gelpuffer überschichtet, um die Entstehung eines ober-
flächlichen Meniskus zu verhindern. Die Polymerisation
geht bei Tageslicht und Zimmertemperatur vor sich und
ist nach etwa 30 Minuten beendet. Die Gellänge beträgt
10 cm.

Nachdem der oberflächliche Gelpuffer wieder entfernt ist,
werden die Röhrchen in die Kammer eingesetzt. Das Auf-
tragen der Proben erfolgt durch den inzwischen aufge-
füllten Elektrodenpuffer hindurch, indem man mitteld
einer Spritze mit langer Kanüle unterschichtet.

Es werden jeweils 100 - 1000 µg Protein in etwa 5 - 100 µl aufgetragen. Um ein gutes Absetzen zu gewährleisten, werden die Proben mit Sacharose angereichert.

Trennbedingungen: Strom: 4 mA pro Röhrchen
Laufrichtung: von oben (-) nach unten (+)
Laufzeit: etwa 3 Stunden

Anfärbung: a) Amidoschwarz
1 g Amidoschwarz 10B in 100 ml 7%iger Essigsäure gelöst und filtriert.
20 Minuten anfärben, in 1%iger Essigsäure über Nacht entfärben.

b) Coomassie
Sofort nach der Elektrophorese schüttelt man das Gel 30 Minuten bei Raumtemperatur in der 10 - 40fachen Volumenmenge einer 12,5%igen Trichloressigsäure-Lösung (TCA). Dann inkubiert man 30 - 60 Minuten im frisch bereiteten Gemisch aus 1 Volumenteil 1%iger, wäßriger Coomassie-Lösung und 19 Volumenteilen 12,5%iger TCA-Lösung. Schließlich überführt man das Gel in 10%ige TCA-Lösung.

2. Elektrophorese bei saurem pH

Literatur: Reisfeld, et al, 1962

Lazarus, G.S. et al., 1968

Elektrodenpuffer: 31,2 g -Alanin
ad 1000 ml aqua dest., pH mit Eisessig auf 4,8

Stammlösungen : (für ein 7,5%iges Gel, bezogen auf Acrylamid)

Lösung A : 24,0 ml 1n NaOH
8,6 ml Eisessig
2,0 ml N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin =
TEMED

Lösung B : 24,0 ml 1n KOH
1,93 ml Eisessig
0,23 ml TEMED

Lösung C : 15,0 g Acrylamid
0,4 g Methylenbisacrylamid

Lösung D: 5,0 g Acrylamid

1,25g Methylenbisacrylamid

Lösung E: 2 mg Riboflavin

Lösung F: 70 mg Ammoniumperoxydisulfat

Die Reagenzien für die Lösungen A - F werden mit aqua dest. auf je 50 ml aufgefüllt. Die Lösungen A - E sind bei + 4°C etwa 3 Wochen haltbar, die Lösung F dagegen nicht länger als etwa 5 Tage.

Durchführung:

Trenngel (= unteres Gel):

Die Lösungen werden in folgendem Verhältnis gemischt:

A : C : H₂O : F = 1 : 2 : 1 : 4

Die Gellänge beträgt 10 cm.

Die in die Röhrchen eingefüllte Mischung wird mit Wasser so überschichtet, daß eine ebene Oberfläche, also kein Meniskus entsteht. Das Gel wird unter UV-Lampe etwa 45 Minuten polymerisiert.

Sammelgel (= oberes Gel):

Die Lösungen werden im folgenden Verhältnis gemischt:

B : D : E : H₂O = 1 : 2 : 1 : 4

Die Mischung wird auf das vom überschichteten Gelpuffer befreite Trenngel pipettiert, wieder mit Gelpuffer überschichtet und etwa 45 Minuten lang polymerisiert.

Trennbedingungen: Strom: 4 mA pro Röhrchen.

Laufrichtung: von oben (+) nach unten (-)

Laufzeit: etwa 4 Stunden

Anfärbung: mit Amidoschwarz 10 B, 20 Minuten (1 g pro 100 ml 7%iger Essigsäure, filtriert).

Entfärbung: mit 1%iger Essigsäure.

Vorbereitung der Proben:

Die Reaktionsgemische der Viskosimetrie werden in ein Eisbad gebracht und mit NaCl auf 20% (Gewichtsprozent) aufgesättigt. Das ausgefällte Kollagen und seine Bruchstücke werden 15 Minuten bei 65 000 xg (Spinco-Zentrifuge) abzentrifugiert und in 0,5 ml 8 m Harnstofflösung, die mit HCl auf pH 5,3 eingestellt ist, gelöst. Nach Dialyse gegen

diese Harnstofflösung in der Kälte werden jeweils etwa 0,05 ml auf das Gel aufgetragen.

3. Segmentierung der Gele

Literatur: Schaub, M. und Strauch, L., 1968

Trennung: Auftrennung des Peptidase - Gipfels aus der trägerfreien Elektrophorese in der analytischen Diskelektrophorese im alkalischen System nach Schaub - Strauch. Es werden 12 Gele von 10 cm Länge angesetzt. Nach Beendigung des Laufes werden 2 Gele mit Amidoschwarz angefärbt. Die übrigen 10 Gele werden mit einer Rasierklinge in jeweils 20 Segmente von 0,5 cm Länge aufgeteilt. Die einander entsprechenden Segmente der einzelnen Gele werden vereinigt und mit 3,0 ml Puffer (0,05 m Tris-HCl pH 7,5, 0,001 m Ca-Acetat) versetzt. Die Gelstückchen lassen sich im Homogenisator nach Potter zerkleinern. Der Gelbrei wird dann in ein Glasfiltergerät (Sartorius) gekippt und durch eine 3,0 μ -Membran (Sartorius 11311) eluiert, indem im Aufnahmegefäß mittels Wasserstrahlpumpe ein Unterdruck erzeugt und zusätzlich auf den Gelbrei mit einem Spritzenkolben ein zarter Druck ausgeübt wird. Die einzelnen Eluate werden dann der Enzymbestimmung zugeführt. Durch einen Vergleich der Enzymverteilung in den Segmenten mit den beiden angefärbten Kontrollgelen kann die Aktivität einer oder mehreren bestimmten Banden zugeordnet werden.

Versuch 5: Bestimmung der Peptidaseaktivität am synthetischen Modell

Literatur: Wünsch, E., Heidrich, H.G., 1963

Pufferlösung: 0,05 m Tris-HCl-Puffer enthaltend 0,001 m Ca-Acetat pH 7,5 (6,06 g Tris + 0,176 g Ca-Acetat in 800 ml aqua dest. aufgelöst, mit 1,0 n HCl auf pH 7,5 gebracht und auf 1000 ml aufgefüllt).

Substratlösung: 100 mg PZ - Pro -Leu - Gly - Pro - D - Arg (Fluka) werden mit 1 ml Methanol vorgelöst und mit der Pufferlösung auf 100 ml aufgefüllt (1 mg Substrat/ml)

Standardlösung von PZ - Pro - Leu:

In einem 50 ml-Meßkolben werden 20,0 mg PZ - Pro - Leu eingewogen und mit Benzol auf 50,0 ml aufgefüllt. Aus dieser Stocklösung wird eine Verdünnungsreihe angesetzt und die Extinktionen der Lösungen bis zu einer Konzentration von etwa 150 / 5 ml bei 320 m μ gemessen (Beckman-Spektrophotometer) (Abb.15).

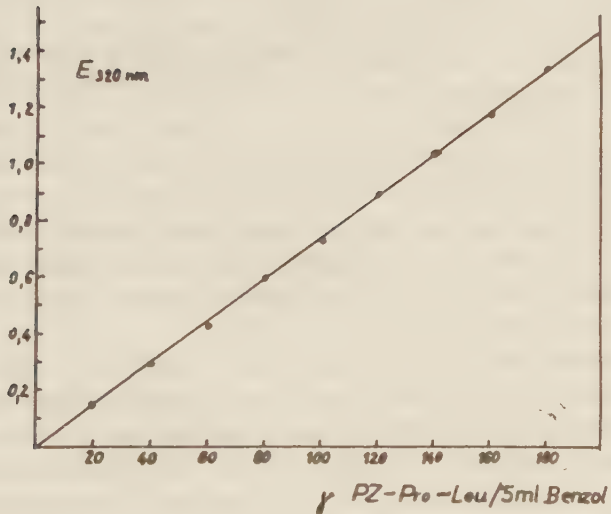


Abb. 15: Eichkurve zur Bestimmung der Peptidase-aktivität am PZ-Substrat

Zitronensäure: 10%ig (g/v) Zitronensäure in aqua dest.

Ausführung der Bestimmung:

1 ml Substratlösung

1 ml Pufferlösung

1 ml Enzymlösung

Inkubation bei 37°C im Wasserbad

Stop mit 1 ml 10%iger Zitronensäure

Ausschütteln mit 5 ml Benzol

Messung der Benzolphase gegen Benzol bei 320 mu.

Blindprobe: Enzymlösung wird unmittelbar vor Abstoppen der Reaktion zugegeben.

Versuch 6: Züchtung für Reinigungszwecke

Gewebekulturflaschen (Bellco Glass Inc. Vineland, New Jersey) werden mit 1 Liter Nährmedium beschickt, die Öffnungen mit Gummistopfen verschlossen, der Deckel mit Vakuumsfett gleichmäßig bestrichen, luftdicht aufgesetzt und mit Klemmen befestigt.

Autoklavierung 20 Minuten bei 2 atü (240°C).

Beimpfung mit 10 ml einer aktiv wachsenden *Achromobacter*kultur aus Thioglycolatmedium. Der überimpfte Stamm wird mittels Ausstrich auf Blutagar hinsichtlich seiner Reinheit kontrolliert, in gleicher Weise wird anschließend eine Probe der neu gewachsenen Kultur geprüft. Das Wachstum erfolgt bei Raumtemperatur. Die Kulturen werden durch einen Magnetrührer ständig in Bewegung gehalten.

Versuch 7: Blutagar

Literatur: Müller, J., Melchinger, H., 1964

2,0 g Nähragar (Merck) und 0,7 g NaCl werden in 100 ml aqua bidest. unter Kochen gelöst.

Sterilisation der Lösung im Autoklaven 15 Minuten bei 121°C.

Danach Abkühlung im Wasserbad auf etwa 50°C.

Zugabe von 5 - 10 ml steril entnommenen Blutes.

Das warme Gemisch wird unter sterilen Bedingungen auf keimfreie Petrischalen ausgegossen. Die Platten werden im Kühlraum bis zur Beimpfung aufbewahrt. Eine Platte wird im Brutschrank zur Infektionskontrolle inkubiert.

Versuch 8: Ultrafiltration

1. Am Filtrationsgerät der Firma Sartorius

Das verwendete Gerät wird von der Firma Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen, unter der Bezeichnung Typ SM 16218 hergestellt. Die Kammer ist innen mit Teflon überschichtet, um den Kontakt des Filtriergutes mit dem Metall zu vermeiden. Das Filtrationsgerät kann auf eine Schüttelmaschine montiert werden, die sich kreisförmig bewegen sollte. Eine solche Anordnung vermeidet weitgehend ein Verstopfen der Membran während der Filtration. Der Versuch wird grundsätzlich bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlraum durchgeführt. Das eingelegte Membranfilter (Bezeichnung: SM 12136) hält Eiweißstoffe mit einem Molekulargewicht von 10 000 und mehr zurück. 200 ml-Portionen werden auf rund 30 ml eingeengt.

2. Am Diaflo-Gerät

Es handelt sich um die Amicon Ultrafiltration Cell Modell 52 der Amicon Corporation Lexington, Massachusetts. In dem Gerät lassen sich 100 ml ziemlich genau auf 5 ml einengen. Die Membranen UM 10 erlauben die Abtrennung von Molekülen mit einem Molekulargewicht unter 10 000.

Versuch 9: Trägerfreie Elektrophorese

Literatur: Hannig, K., 1968

Apparatur: Elektrophoreseapparatur VAP III

Hersteller: Fa. Desaga GmbH, Heidelberg; Fa. Bender und Hobein GmbH, München.

Elektrodenpuffer: 60,5 g Tris/ 5 Liter mit 32%iger HCl auf pH 8,0 eingestellt.

Spez. Leitfähigkeit: 0,001 S

Kammerpuffer: 300 ml Elektrodenpuffer mit 0,005 m Ca-Acetat-Lösung
(4,2 g/5 Liter) auf 5 Liter auffüllen (vor dem Auf-
füllen wird pH nochmal kontrolliert und auf 8,0 einge-
stellt):

Spez. Leitfähigkeit: 0,00075 S

Spannung: 1030 Volt

Stromstärke: 110 mA

Temperatur: +7°C

Kammerpufferdurchsatz: 180 ml/h

Einspritzstelle: entsprechend Fraktion 70

Einspritzgeschwindigkeit: 3 ml/h

Proteindurchsatz: 30 mg/h

Versuch 10: Radioaktiv markiertes Kollagen

1. Herstellung

Literatur: Bornstein, P. und Piez, K.A., 1966

Kühn, K. et al., 1964

10 Mehrschweinchen von etwa 200 g Gewicht werden jeweils 100 uC
(Mikrocurie) ^{14}C -Glycin (Radiochemical Centre Amersham) intraperi-
toneal verabreicht. Nach Ablauf von 6 Stunden werden die Tiere getö-
tet. Die Haut wurde abgezogen, mehrfach in 2 Liter Wasser gewaschen
und durch einen Fleischwolf gedreht. Danach wurde der Hautbrei gewo-
gen, zwei mal in kaltem Wasser gewaschen.

Neutralsalzlösliches Kollagen (NLK):

Die Haut wurde in der 10-20-fachen Menge (bezogen auf das Gewicht)
in kalter 1 m NaCl, enthaltend 0,05 m Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen,
für 24-48 Stunden in der Kälte aufbewahrt und dabei etwa 8 mal um-
geschüttelt. Nötigenfalls erfolgte pH-Korrektur mit 10%iger NaOH.

Die Suspension wurde dann durch mehrere Lagen Verbandsmull fil-
triert, der Rückstand zur nächsten Extraktion aufbewahrt, das Filtrat
durch Passieren eines Kieselgel-Kuchens in einem Buchner-Trichter
gereinigt und entfettet.

Die Kochsalzkonzentration des Filtrates wurde langsam auf 20% gebracht und das Kollagen damit ausgefällt.

Nach Zentrifugation bei 8000 rpm (Sorvall, GSA-Rotor) für 30 Minuten konnten die vereinigten Präzipitate einer dreimaligen Waschung in 500 ml kalter 20%iger NaCl zugeführt werden. Jeder Waschung folgte die Zentrifugation wie oben.

Der Niederschlag der letzten Waschung wurde in aqua dest. unter Rühren gelöst, die ungelösten Bestandteile durch Zentrifugation entfernt.

Durch Ansäuerung der Lösung mittels 0,5 m Essigsäure auf pH 4,0 erfolgte eine letzte Umfällung mit anschließender Zentrifugation bei 8000 rpm (Sorvall, GSA-Rotor). Das Präzipitat wurde in etwa 100 ml 0,5 m Essigsäure gelöst und ausgiebig gegen 1%ige Essigsäure dialysiert.

Das lyophilisierte Material wurde bei -20°C im Exsikkator über Phosphorpentoxid aufbewahrt.

Die Neutralsalzextraktion wurde 3 mal durchgeführt.

Säurelösliches Kollagen (SLK)

Die Hautrückstände der Neutralsalzextraktion wurden ausgiebig in kaltem aqua dest. gewaschen und zwei mal mit der 10-fachen Menge Natrium-Citrat-Puffer pH 3,7 extrahiert.

Nach Filtration durch einen Kieselgel-Kuchen wurde die NaCl-Konzentration des Filtrates auf 5% aufgesättigt, damit das Kollagen ausgefällt und durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 8000 rpm (Sorvall, GSA-Rotor) in den Niederschlag gebracht wird.

Dieses Präzipitat wurde in 1-2 Liter 1 m NaCl, enthaltend 0,05 m Tris-HCl pH 7,5, gelöst, die NaCl-Konzentration auf 20% erhöht, das Kollagen ausgefällt, wie oben abzentrifugiert, in aqua dest. wieder in Lösung gebracht und gegen Wasser dialysiert. Nach Lyophilisation erfolgte die Aufbewahrung analog des NLK.

NLK und SLK wurden im Gewichtsverhältnis 1:7 gemischt in mit Essigsäure angesäuertem aqua dest. gelöst und erneut lyophilisiert. Dieses Material diente für die Enzymbestimmungen. Die Extraktionen wurden sämtlich in der Kälte durchgeführt.

2. Durchführung der Enzymbestimmung

Literatur: Nagai, Y., Lapiere, C.M. und Gross, J., 1966

Bray, G.A., 1960

Kollagenlösung: 4 mg ^{14}C -Kollagen/ml 0,1%ige Essigsäure

Puffer: 0,2 m Tris-HCl pH 7,5 (26,2 g Tris/Liter)
0,001 m Ca-Acetat (0,176 g Ca-Acetat/Liter)

Ansatz: 0,25 ml Kollagenlösung
0,25 ml Puffer

gut mischen und zur Gelierung mindestens 6 Stunden bei 37°C inkubieren
0,5 ml Enzymlösung

Inkubation 6 Stunden bei 37°C. Danach 30 Minuten bei 20 000 rpm und 30°C in der vorgewärmten Zentrifuge (Sorvall, Rotor SS 34) zentrifugieren. Überstand abkippen.

0,4 ml Überstand
4,0 ml Äthanol absolut
5,0 ml Bray'sche Lösung

Messung dieses Gemisches im Scintillationszähler (Tricarb-Liquid-Scintillation-Counter, Packard).

Versuch 11: Bestimmung unspezifischer proteolytischer Aktivität nach Kunitz (Kunitz, M., 1947).

Substratlösung: 1g Casein in 10 ml 0,1n NaOH vorlösen, mit Puffer ad 100,0 ml auffüllen, pH auf 7,5 einstellen.

Pufferlösung: 0,05m Tris-HCl-Puffer enthaltend 0,001m Ca-Acetat, pH 7,5 (6,06 g Tris + 0,176 g Ca-Acetat in 800 ml aqua dest. aufgelöst, mit 1,0m HCl auf pH 7,5 gebracht und auf 1000,0 ml aufgefüllt.

Ansatz: 1,0 ml Substratlösung
1,0 ml Enzymlösung

5 min. getrennt bei 37°C vorinkubieren, danach vereinigen und 20 min. inkubieren. Stop mit 3,0 ml 5%iger Trichloressigsäure, Zentrifugation bei 8000 xg. Messung der Extinktion im Überstand bei 280 mμ gegen Blindprobe ohne Enzym.

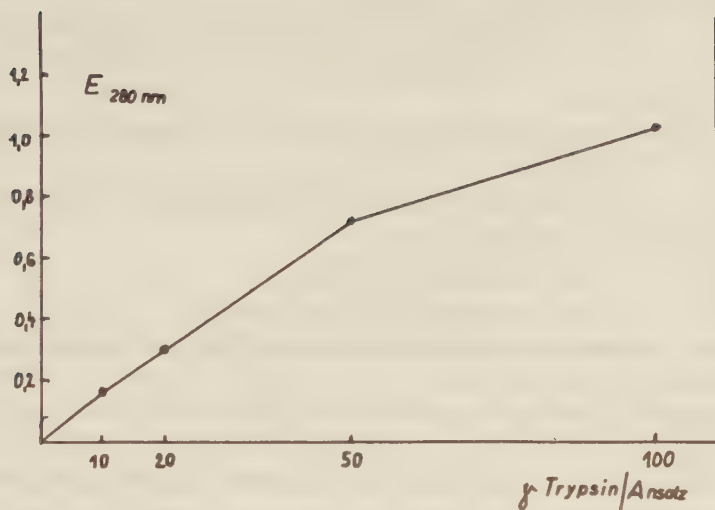


Abb. 16: Eichkurve zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Trypsin an Casein als Substrat

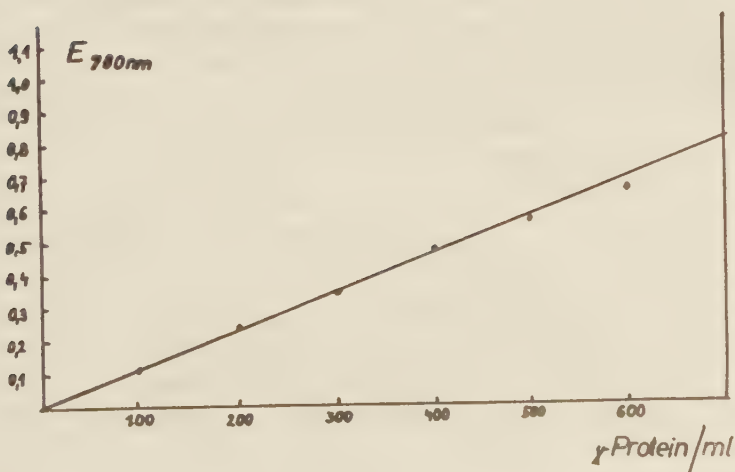


Abb. 17: Eichkurve zur Proteinbestimmung nach Folin

Versuch 12: Proteinbestimmung nach Folin

Literatur: Folin, O. und Ciocalteu, V., 1927;

Schaub, M., 1967

Reagenzien: 1 Teil Phenolreagenz nach Folin - Ciocalteu + 3 Teile

H_2O

13,5%ige wässrige Lösung von Na-Carbonat (H_2O -frei)

Bestimmung: 1,0 ml Probe

1,0 ml Na-Carbonat 13,5%ig

1,0 ml Phenolreagenz (1:4 verdünnt)

Nach 30 Minuten bei 780 mμ gegen Blindprobe messen (Beckman-Spektrophotometer).

Blindprobe: An Stelle der Probe 1,0 ml Pufferlösung.

Eichkurve: Aufstellung einer Verdünnungsreihe standardisierten Serums (Lab-Trol, Behring-Werke) und Bestimmung nach Folin (Abb. 17)

Versuch 13: Hydroxyprolinbestimmung

Literatur: Stegemann, H., 1958

Moore, S. und Stein, W.H., 1948

Reagenzien: 12n HCl

Puffer: 50,0 g Citronensäure x H_2O

120,0 g Na-Acetat x $3H_2O$

34,0 g NaOH

ad 1000 ml H_2O

pH 6,0

Gemisch: 10,0 ml H_2O

15,0 ml n-Propanol

25,0 ml Puffer

Chloramin-T-Lösung: 0,420 g/50,0 ml Gemisch (täglich frisch zubereitet)

Perchlorsäure: 25,5 ml Perchlorsäure ad 100 ml H_2O

p-Dimethylaminobenzaldehyd: 5 g/100 ml n-Propanol (täglich frisch zubereitet)

L-Hydroxyprolin-Standard-Lösung: 10,0 mg L-Hydroxyprolin (Merck)
werden in 100 ml 0,001 n HCl gelöst = Stammlösung. Diese Stammlösung wird 1:10 bzw. 1:20 mit Wasser verdünnt, entsprechend 10 bzw. 5 Hypro/ml.

Durchführung: 1,0 ml der zu analysierenden Lösung werden über Nacht nach Zugabe von 1,0 ml 12 n HCl bei 105°C hydrolysiert. Die Proben werden am Rotationsverdampfer eingedampft, mit 1,0 ml H_2O nachgewaschen und erneut eingedampft. Zugabe von 4,0 ml H_2O sowie einer Spatelspitze Aktivkohle zur Adsorption der Farbstoffe und anschließend Filtration durch 0,45 μ -Membran (Typ 11603, Sartorius-Membranfilter-GmbH). 1,0 ml des Filtrates werden mit 1,0 ml Chloramin-T-Lösung geschüttelt, 20 Minuten stehengelassen, mit 1,0 ml Perchlorsäure versetzt und 5 Minuten stehengelassen. Nach Zusatz von 1,0 ml p-Dimethylaminobenzaldehydlösung wird 18 Minuten im Wasserbad von 60°C inkubiert und nach Abkühlen der Proben die Extinktion bei 550 m μ gegen eine Blindprobe, bei der nur H_2O in die Bestimmung eingesetzt wurde, gemessen (Beckman-Spektralphotometer). Den Hydroxyprolingehalt der unbekannten Lösung ermittelt man aus der zur gleichen Zeit gewonnenen Eichkurve mit 5 und 10 γ Hydroxyprolin/ml.

Versuch 14: Stickstoffbestimmung

Literatur: Strauch, L., 1965

Reagenzien:

Aufschlußreagenz: 2 g Selen werden in 250 ml konzentrierter H_2SO_4 solange erhitzt, bis die Lösung klar und farblos geworden ist. Nach dem Erkalten werden tropfenweise 250 ml einer gesättigten Kaliumsulfatlösung zugegeben.

Nesslerreagenz (Merck)

Stickstoffstandardlösungen: 0,1179 g Ammoniumsulfat (im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet) werden in 250 ml 0,2n H_2SO_4 gelöst. 1,0 ml entsprechen 100 γ Stickstoff. Von dieser Lösung wird eine Verdünnungsreihe entsprechend 5 - 100 γ N/ml angesetzt.

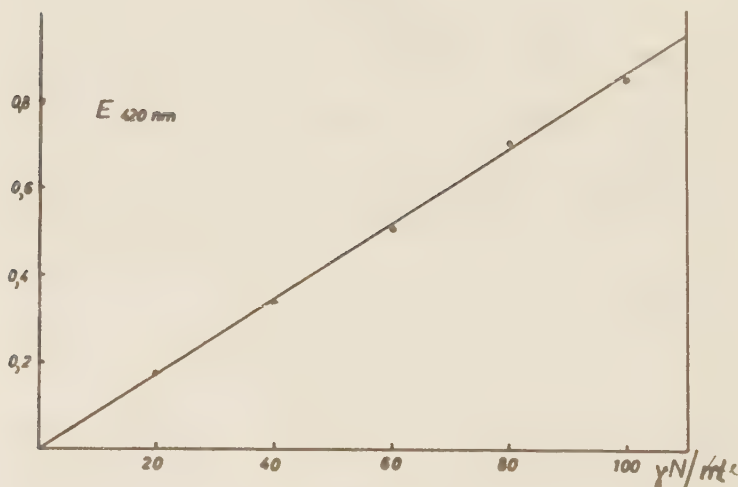


Abb. 18: Eichkurve zur Bestimmung des Stickstoffes

Durchführung:

Der nach Zentrifugation verbleibende Bakterienniederschlag wird mit 0,2 ml Aufschlußreagenz versetzt und im Thermoblock ("Thermoblock" von der Fa. Wissenschaftliche-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) langsam auf $320^{\circ}C$ erhitzt. Sind die Proben farblos, läßt man sie abkühlen und setzt dem Rückstand 9,9 ml H_2O zu. Nach Umschütteln entnimmt man 3,0 ml und fügt 1,0 ml H_2O sowie 2,0 ml Nesslerreagenz hinzu. Nach mindestens 10 Minuten Farbentwicklung wird die Extinktion bei

420 m μ (Beckman-Spektrophotometer) gegen einen Blindwert, der sich aus 2,0 ml Nesslerreagenz und 4,0 ml H₂O zusammensetzt, gemessen. Der Stickstoffgehalt der Proben kann dann aus einer Eichkurve ermittelt werden, die durch Einsatz von jeweils 1 ml der N-Standards in die Bestimmung gewonnen wurde (Abb.18).

Versuch 15: Säulenchromatographie

Literatur: Informationsschrift der Fa. Bio-Rad

1. Trennung an Bio-Gel A 1,5; 200-400 mesh

Elutionspuffer: 0,05 m Tris-HCl pH 8,0,
0,005 m Ca-Acetat

Säulenmaße: 1,5 x 79 cm

Durchflußgeschwindigkeit: 10 ml/Stunde

Probe: 105 mg Protein in 6 ml

2. Trennung an Bio-Gel A 0,5; 200-400 mesh

Elutionspuffer: 0,05 m Tris-HCl pH 8,0
0,005 m Ca-Acetat

Säulenmaße: 1,5 x 88 cm

Durchflußgeschwindigkeit: 10 ml/Stunde

Probe: 80 mg/ 5 ml

Versuch 16: Auftrennung der PZ-Substratspaltstücke in der Dünnschichtchromatographie

Literatur: Stahl, E., 1962

Es werden Kieselgel-G-Platten mit einer Schichtdicke von 0,25 mm verwendet.

Laufmittel: n-Butanol/ Eisessig/ H₂O/ Pyridin = 45/ 9/ 36/ 30 (v/v)
Laufhöhe: 10 cm

Proben: PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg, (Fluka)

Testsubstanz PZ - Pro - Leu (Fluka)

Rückstand aus den eingedampften Benzolphasen mehrerer Peptidaseansätze.

Alle Proben werden in Methanol gelöst und aufgetragen.

Versuch 17: Molekulargewichtsbestimmung der Peptidase an einer
Bio-Gel A O,5-Säule

Literatur: Fritz, H., Trautschold, J., Werle, E., 1965

Chromatographiebedingungen: s. Versuch 15,2.

Markersubstanzen: Catalase (MG = 230 000), Rinderalbumin (MG = 67 000)
(" Molecular Weight Markers" Kit. No. 8109, Fa.
Mann Research Laboratories, Inc., New York, N.Y.)

Bestimmung des Leervolumens der Säule mit Dextranblau (Merck).

Die Marker einschließlich der gereinigten Peptidase werden in einem
getrennten Lauf chromatographiert. Die Elutionskurve wird durch Ab-
sorptionsmessungen der Fraktionen bei 280 m μ und 405 m μ (Soret-Bande
der Catalase) bestimmt.

Die bestimmten Elutionsvolumina der Testsubstanzen von bekanntem Mo-
lekulargewicht ermöglichen sodann die Aufstellung einer Eichgeraden
(Abb. 17), aus der durch Einsetzen des V_E/V_0 - Wertes der zu unter-
suchenden Substanz deren Molekulargewicht abgelesen werden kann.

Versuch 18: Bestimmung des pH-Optimums der Peptidase

Pufferlösungen:

Stocklösung: 0,2 m Tris (24,200 g/ Liter)

0,2 m Na-Acetat (2,910 g/Liter)

0,02 m Ca-Acetat (0,352 g/Liter)

Herstellung der pH-Lösungen, indem je 100 ml Stocklösung mit 1n HCl
auf pH 5,0 bis pH 9,5 eingestellt wird.

Substratlösung: 100,0 mg PZ-Substrat werden in 1,0 ml Methanol vor-
gelöst und mit physiol. NaCl-Lösung auf 50,0 ml auf-
gefüllt.

Enzymlösung: Gereinigte Peptidase in Säulenpuffer (0,05 m Tris-HCl
pH 8,0, 0,005 m Ca-Acetat)

Bestimmung: 0,2 ml Probe

2,8 ml Pufferlösung

0,5 ml Substratlösung

Die Inkubationszeit beträgt 2 Stunden bei 37°C. Stop der Reaktion
mit 1,0 ml 25%iger Citronensäure. Diese im Vergleich zur üblichen

Peptidasebestimmung erhöhte Konzentration ist nötig, um mit Sicherheit die zur Extraktion des Bruchstückes PZ - Pro -Leu nötige Ansäuerung zu erzielen.

Weitere Durchführung s. Versuch 5.

Blindwerte: Zu jedem pH-Wert wurde ein Blindwert mitbestimmt, indem statt 0,2 ml Enzymlösung 0,2 ml Säulenpuffer in den Ansatz eingesetzt wurden.

Versuch 19: Ermittlung der Michaeliskonstanten der Peptidase

Literatur: Dixon, M. und Webb, E.C., 1964

Puffer: 0,05 M Tris-HCl pH 8,5 (0,06 g/Liter)

0,001 M Ca-Acetat (0,176 g/Liter)

Substratstocklösungen: A: 81,2 mg PZ-Substrat/ 50,0 ml Puffer
entsprechend 2 μ M/ml

B: 81,2 mg PZ-Substrat/ 25,0 ml Puffer
entsprechend 4 μ M/ml

Enzymlösung: gereinigte Peptidase

Durchführung: Aus den Substrat-Stocklösungen wird mit Puffer eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei für 0,1 - 2,0 μ M Substrat/ Ansatz Stocklösung A, für 2,4 - 4,0 μ M Substrat/ Ansatz Stocklösung B verwendet wird. Endvolumen sind jeweils 2,0 ml.

Zugabe von 1,0 ml Enzymlösung

Inkubation 1 Stunde bei 37°C

Stop der Reaktion mit 1,0 ml 25%iger Citronensäure

Extraktion mit 10,0 ml Benzol (im Gegensatz zu Versuch 5 wurde statt mit 5,0 ml mit 10,0 ml Benzol ausgeschüttelt, um die Blindwerte bei den hohen Substrateinsätzen möglichst niedrig zu halten. Zum Ausgleich wurde mit einer sehr aktiven Enzymlösung gearbeitet).

Weiterer Arbeitsgang s. Versuch 5.

Die graphische Ermittlung der Michaeliskonstanten zeigt Abb.13

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Bakterienstamm der Familie *Achromobacter* hinsichtlich eventueller kollagenolytischer Eigenschaften untersucht. Als Substrat dienten natives Kollagen sowie das synthetische Modellpeptid PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg. Letzteres stellt eine Sequenz der apolaren Bereiche des Kollagenmoleküls dar und wird von der Clostridienpeptidase A, der hervorragensten unter den wenigen bisher bekannten Kollagenasen in hochspezifischer Weise gespalten.

2. Bei der Suche nach Nährmedien, die optimales Bakterienwachstum neben maximaler enzymatischer Aktivität gewährleisten sollten, zeigte sich, daß ein Abbau des nativen Kollagens, wie er durch Bestimmung der spezifischen Viskosität und Auftrennung in der analytischen Diskelektrophorese nachgewiesen wurde, nur mit solchen Kulturen erzielt werden konnte, die in Gegenwart von Kollagen in nativer oder denaturierter Form aufgewachsen waren. Spaltung des synthetischen Substrates trat in allen Medien auf, die positives Wachstum ergaben.

3. Auftrennungen von Kulturfiltraten an der trägerfreien Elektrophorese demonstrierten, daß die Spaltung der beiden angebotenen Substrate auf die Existenz von mindestens zwei verschiedenen Enzymen zurückzuführen ist.

Das Enzym, welches das synthetische Substrat zu spalten vermochte, wurde als Peptidase bezeichnet, dasjenige mit kollagenolytischer Aktivität als kollagenolytisches Enzym.

Durch Gegenüberstellung der elektrophoretischen Diagramme verschieden aufgebauter Nährlösungen wurde noch deutlicher, daß die Bildung der kollagenolytischen Aktivität in den Keimen von der Anwesenheit von Kollagen abhängig ist. Ein Induktionsmechanismus wurde diskutiert.

4. Das kollagenolytische Enzym zeigte geringe unspezifische Proteasewirkung. Viskosimetrische und diskelektrophoretische Untersuchungen ergaben, daß die Spaltung des Kollagens langsamer als

durch Clostridienpeptidase A verläuft und nach einem Abfall der spezifischen Viskosität um 30% zum Stillstand kommt.

5. Wegen ihrer mit der Clostridienpeptidase A übereinstimmenden Spezifität gegenüber dem Kollagenmodellpeptid wurde die Peptidase einer Reinigung unterzogen, um einen näheren Vergleich dieser beiden Enzyme zu ermöglichen.

Der Reinigungsablauf umfaßte Ultrafiltration, trägerfreie Elektrophorese und Gelfiltration an Bio-Gel A 0,5.

Die Kombination der Reinigung nach dem Gesichtspunkt der Ladung und des Molekulargewichtes ergab in nur drei Schritten die hohe Anreicherung von etwa 1500-fach.

Diskelektrophoretisch zeigte die gereinigte Präparation eine Bande, die sich präparativ mit der gesuchten enzymatischen Aktivität identisch erwies. Eine zarte zweite Bande deutete noch eine leichte Verunreinigung an.

6. Dünnschichtchromographisch ließ sich nachweisen, daß die Spaltung des Substrates PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg genau zwischen Leu und Gly erfolgte und damit mit der der Clostridienpeptidase A übereinstimmte.

7. Bei der Molekulargewichtsbestimmung an Bio-Gel A 0,5 ließ sich ein Molekulargewicht von 140 000 bestimmen.

8. Das pH-Optimum der Peptidase zeigte im Puffersystem Tris-HCl-Acetat ein breites Plateau zwischen 8,5 und 9,5.

9. Die starke Affinität des Enzyms gegenüber dem synthetischen Substrat drückt sich in der Michaeliskonstanten von $8,3 \times 10^{-5} \text{ M/Liter}$ aus.

10. Selbst bei hohen Einsätzen der gereinigten Peptidase in Kollagenansätze stellte sich heraus, daß trotz der ungewöhnlich starken Affinität zum Modellpeptid keinerlei Spaltung des natürlichen Substrates, des nativen Kollagens, eintrat.

11. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte man sagen, daß sich die Parallelität zwischen der *Achromobacter*peptidase und der *Clostridium*peptidase A lediglich auf die Aktivität gegenüber dem Substrat PZ - Pro - Leu - Gly - Pro - D - Arg beschränkt.

Ferner bewiesen die Versuche eindeutig, daß eine Spaltung des Modellpeptids keinesfalls einen Rückschluß auf einen kollagenolytischen Abbau zuläßt, wie verschiedentlich kritiklos angenommen wurde.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- Aer, J. and Kivirikko, K.J., Z. Physiol. Chem. 350, 87 (1969)
- Beisenherz, F. et al., Z. Naturforschung 86, 555 (1953)
- Bienstock, B., Z. Klin. Med. 8, 1 (1884)
- Bornstein, P. and Piez, K.A., Biochemistry 5, 3460 (1966)
- Boulard, Ch., Comp. rend. Acad. Sc. Paris, Serie D, 270, 1949 (1970)
- Bray, G.A., Anal. Biochem. 1, 279 (1960)
- Dixon, M. and Webb, E.C., Enzymes 2 nd ed. Academic, 1964
- Drake, M.P. et al., Biochemistry 5, 301 (1966)
- Eisen, A.Z., Bauer, E.A., Jeffrey, J.J., J. Investig. Dermatolog. 55, 559 (1970)
- Engel, J., Dissertation, Univ. München, 1962
- Espey, L.L. and Rondell, P., Am. J. Physiol. 214, 326 (1968)
- Folin, O., Ciocalteu, V., J. Biol. Chem. 73, 627 (1927)
- Fritz, H., Trautschold, J., Werle, E., Z. Physiol. Chem. 342, 253 (1965)
- Gallop, P.M., Arch. Biochem. Biophys. 54, 486 (1955)
- Granath, K.A. u. Flodin, P., Makrom. Chem. 48, 160 (1961)
- Grassmann, K., Hörmann, H., Nordwig, A. u. Wunsch, E., Z. Physiol. Chem. 316, 287 (1959)
- Grassmann, K., Strauch, L. u. Nordwig, S., Z. Physiol. Chem. 332, 325 (1963)
- Gries, G. u.a., Experientia 26, 31 (1970)
- Gries, G. u. Grasedyk, K., Verh. Dtsch. Ges. Path. 53, 205 (1969)
- Gross, J. and Lapiere, C.M., Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 1014 (1962)
- Gross, J. and Nagai, Y., Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 1197 (1965)
- Hannig, K., Habilitationsschrift, Univ. München 1964
- Hannig, K., Jahrbuch d. Max-Planck-Gesellschaft, S. 117, 1968
- Harper, E., Gross, J., Biochem. Biophys. Acta 198, 286 (1970)
- Hausmann, E., Kaufmann, E., Biochem. Biophys. Acta 194, 612 (1969)
- Heidrich, H.G. u.a., Z. Physiol. Chem. 350, 1430 (1969)
- Hobson, R., Biochem. J. 25, 1458 (1931)
- Jackson, D.S., Bioch. J. 65, 277 (1957)
- Jennison, M.W., J. Bacteriol. 54, 55 (1947)
- Kühn, K. et al., Z. Physiol. Chem. 336, 4 (1964)
- Kühn, K., Fietzek, P. u. Kühn, J., Biochem. Z., 344, 418 (1966)
- Kunitz, M., J. Gen. Physiol. 30, 291 (1947)
- Lazarus, G.S. et al., J. Clin. Invest. 47, 2622 (1968)

- Levdikova, G.A., Biochemia 31, 821 (1966)
- Mac Lennan, J.D., Mandl, I., Howes, E.L., J. Clin. Invest. 32, 1317 (1953)
- Mandl, I., Advanc. Enzymol. 23, 163 (1961)
- Maschmann, E., Biochem. Z. 295, 1 (1937)
- Maurer, H.R., Diskelektrophorese, Walter de Gruyter u. Co, Berlin, 1968
- Mehl, E. u. Jatzkewitz, H., Z. Physiol. Chem. 339, 260 (1964)
- Moore, S., Stein, W.H., J. Biol. Chemistry 176, 370 (1948)
- Müller, J., Melchinger, H., Methoden der Mikrobiologie, Frankh'sche
Verlagsbuchhandlung 1964
- Nagai, Y., Noda, H., Biochem. Biophys. Acta 34, 298 (1959)
- Nagai, Y., Lapiere, C.M. and Gross, J., Biochemistry 5, 3123 (1966)
- Neumann, R.E. and Tytell, A.A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 73, 409 (1950)
- Nordwig, A., Leder 13, 10 (1962)
- Nordwig, A., Dehm, P. u. Jahn, W.F., Protides of Biol. Fluids 15, 531 (1967)
- Nordwig, A. u. Jahn, W.F., Europ. J. Biochem. 3, 519 (1968)
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Williams, D.E., Nature 195, 281 (1962)
- Ruckdeschel, G. (1970) mündl. Mitteil.
- Schaub, M., 1967, laborinterne Meth.
- Schaub, M. u. Strauch, L., Z. Physiol. Chem. 349, 809 (1968)
- Seifter, S. et al., J. J. Biol. Chem. 234, 285 (1959)
- Schoellmann, G. u. Fischer, E., Biochem. Biophys. Acta 122, 557 (1966)
- Slansky, H.H., Freeman, M.I. and Itoi, Arch. Ophthalm. 80, 496 (1968)
- Stahl, E., Springer-Verlag, "Dünnschichtchromatographie", 1962
- Stegemann, H., Z. Physiol. Chem. 311, 41 (1958)
- Strauch, L., Z. Klin. Chem. 5, 165 (1965)
- Strauch, L., Archs. Biochem. Cosmetol. 10, 11 (1967)
- Strauch, L., Vencelj, H., Z. Physiol. Chem. 348, 534 (1968)
- Strauch, L., Umsch. Wiss. Techn. 69, 310 (1969)
- Strauch, L., Labo 8, 557 (1970)
- Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, IV. Edition,
1961 London, Edward Arnold LTD
- Waldvogel, F.A. and Swartz, M.N., J. Bacteriology 93, 662 (1969)
- Waterhouse, D. u. Irzykiewicz, H.J., Insect. Physiol. 1, 18 (1957)
- Woessner, J.F. jr., Arch. Biochem. Biophys. 93, 440 (1961)
- Wünsch, E., Z. Phys. Chem. 332, 295 (1963)
- Wünsch, E., Heidrich, H.G., Z. Physiol. Chem. 332, 300 (1963)
- Yoshida, E. u. Noda, H., Biochem. Biophys. Acta 105, 562 (1965)

Lebenslauf:

Geboren am 28.2.41 in Augsburg.

Eltern: Ernst Lang und Frau Emilie geb. Weber.

1947-1952 Besuch der Volksschule in Augsburg.

Von 1952 bis 1961 Besuch des humanistischen Gymnasiums bei St. Anna in Augsburg mit abschließender Reifeprüfung.

Ableistung des Wehrdienstes von 1961-1962.

Anschließend Beginn des Medizinstudiums an der Universität Erlangen-Nürnberg. Weiteres Studium in Innsbruck und München, wo im Frühjahr 1969 das Staatsexamen abgelegt wurde.

Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit im Frühjahr 1970

Beginn der Tätigkeit im Max-Planck-Institut für Eiweiß und Lederforschung mit Untersuchungen zum Tumorwachstum.

Durchführung der Doktorarbeit am gleichen Institut vom Sommer 1970 bis Frühjahr 1971.

